

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Lucien CRONENBERGER

Ingénieur E.S.C.I.L.

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'Étude de la Biochimie comparée de quelques Prunus

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 9 Juillet 1960 devant la Commission d'Examen

MM. R. KUHNER

Président

J. COLONGE

J. CHOPIN

C. MENTZER

}

Examineurs

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Lucien CRONENBERGER

Ingénieur E.S.C.I.L.

PREMIÈRE THÈSE

Contribution à l'Étude de la Biochimie comparée de quelques *Prunus*

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 9 Juillet 1960 devant la Commission d'Examen

MM. R. KUHNER
J. COLONGE
J. CHOPIN
C. MENTZER

Président

Examineurs

UNIVERSITÉ DE LYON – FACULTÉ DES SCIENCES

Doyens Honoraires

MM. LONGCHAMBON
DOUIN

Professeurs Honoraires

MM. LOCQUIN
de LARAMBERGUE
DOEUVRE
SOLLAUD
MENTZER
MOUSSA

Doyen

M. H. GAUTHIER

Assesseur

M. PRETTRE

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie	DUFAY	Astronomie
DOUIN	Botanique	NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER H.	Géologie	VIRET	Géologie
DEJARDIN	Physique générale	WAUTIER	Zoologie
EYRAUD Henri	Calcul différentiel et intégral	CHOPIN	Chimie biologique
PRETTRE	Chimie industrielle	BRACONNIER	Mathématiques
COURTY	Chimie-physique	CUEILLERON	Chimie
KÜHNER	Microbiologie et Mycologie	EYRAUD Charles	Chimie minérale
CORDIER	Physiologie	BOUTILLIER	Minéralogie
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée	BOIDIN	Botanique
PARIS	Chimie minérale	JAFFARD	Mathématiques
AUMERAS	Chimie	MESNARD	Physique
COLONGE	Chimie organique	GIGOUT	Géologie
JANIN	Physique générale	LAFOUCRIERE	Physique nucléaire
FLANDRIN	Géologie appliquée	LAVIOLETTE	Zoologie
BERNARD René	Physique industrielle	DREUX	Chimie
		GRANDMONTAGNE	Physique

Maitres de Conférences

MM. TEICHNER	Chimie industrielle	LAFORGUE	Physique
DEPRAZ	Physique nucléaire	BERSILLON	Physiologie végétale
FERON	Mathématiques		S. P. C. N.
PISTOULET	Physique générale	LEGAY	Zoologie expérimentale
GAUME	Physique		S. P. C. N.
PACHECO	Chimie biologique	UZAN	Physique S. P. C. N.
PAVANS de CECCATY	Zoologie	DAVID Louis	Géologie
MERLIN	Chimie M. P. C.	GAUTHIER Jean	Chimie
PHILBERT	Physique nucléaire	CHENEVOY	Géologie appliquée
PERES	Physiologie	MAITROT	Physique

Maitres de Conférences Adjoints

Mme FIASSON	Zoologie	FIASSON	Zoologie - Agrégation
MM. PENNANEAC'H	Mathématiques générales	TRANCHAT	Physique - Chimie
BERNARD Roger	Physique		Agrégation
COTILLON	Géologie appliquée	SALLES	Mathématiques
STRIFFLING	Météorologie et Physique du Globe	PERNOUX	Physique
MAZENOT	Géologie - Agrégation	EYRAUD Y.	Physique
MURET	Botanique - Agrégation	BENE	Physique
		CHALLEAT	Mathématiques

Secrétaire M. A. ROUX



A Monsieur C. MENTZER
Professeur au Museum National d'Histoire Naturelle

Hommage de profond respect et de vive gratitude

A Monsieur J. CHOPIN
Professeur à la Faculté des Sciences de Lyon

Témoignage de vive reconnaissance



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

Le travail que nous présentons a été réalisé au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lyon.

Avant de l'exposer, nous prions Monsieur le Professeur C. Mentzer de bien vouloir trouver ici l'expression de notre sincère gratitude pour l'aide, les conseils et les encouragements qu'il nous a souvent prodigués au cours de nos recherches.

Nous tenons à remercier particulièrement Monsieur le Professeur Chopin d'avoir toujours considéré avec une bienveillante attention l'évolution de notre travail. Nous sommes heureux de pouvoir lui témoigner nos sentiments très reconnaissants.

Qu'il me soit permis également de remercier Monsieur le Professeur Kuhner qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury et Monsieur le Professeur Colonge qui a accepté d'y prendre part.

Nos remerciements vont aussi à Monsieur le Directeur du Centre National de la Recherche Scientifique pour l'aide matérielle qui a permis la réalisation de ce travail.

Enfin, nous ne saurions oublier le concours de nos camarades. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance pour la sympathie qu'ils nous ont témoignée.

INTRODUCTION

Le développement de la chimie des substances naturelles remonte au XVIIIème siècle avec les travaux de Scheele [97]. Cet auteur dont l'œuvre est considérable tant en chimie minérale qu'en chimie organique, a proposé une première méthode d'extraction des corps organiques et isolé les acides citrique, malique, tartrique et lactique.

Dans le domaine des pigments végétaux, les premières recherches apparaissent au début du siècle dernier avec les travaux de Chevreul [19] à qui l'on doit entre autres, l'isolement de la quercétine à partir de l'écorce de chêne et celui de la lutéoline extraite du réséda luteola.

Peu à peu la constitution chimique des substances naturelles a pu être élucidée grâce aux perfectionnements des méthodes analytiques. A l'heure actuelle, on connaît la structure de plusieurs milliers de substances végétales et le développement de la chimie organique a permis dans de nombreux cas de vérifier les hypothèses de structure et de remplacer les produits naturels par les dérivés synthétiques correspondants.

La diversité et souvent la complexité de la structure des constituants chimiques du règne végétal ont provoqué l'admiration des biochimistes quant aux mécanismes par lesquels les plantes et les microorganismes réalisent leur synthèse. Des hypothèses ont alors été avancées sur le mode de formation "in vivo" des constituants végétaux. A l'heure actuelle, la méthode la plus raisonnable permettant de vérifier ces hypothèses biogénétiques consiste à utiliser des molécules marquées, c'est-à-dire à administrer à la plante une molécule d'un précurseur hypothétique dans laquelle l'un des atomes de carbone est radioactif. Cependant, l'application d'une telle technique nécessite tout d'abord la solution de quelques problèmes préliminaires concernant le métabolisme normal de la plante étudiée. Il faut, en effet, inventorier les constituants d'une plante, apprendre à les déceler par des moyens simples et suivre l'évolution de leur teneur en fonction de la saison. L'administration des précurseurs hypothétiques marqués au ^{14}C doit se faire au moment précis où le composé dont on veut étudier la biogénèse se forme abondamment dans un organe déterminé de la plante.

Le présent travail est en quelque sorte une introduction à l'étude biogénétique des constituants du genre *Prunus*. Nous nous sommes proposés de déterminer quels sont les principaux Hydrates de Carbone, acides organiques et pigments flavonoïdes des feuilles de quelques *Prunus* : le merisier

(*P. avium*), l'abricotier (*P. armeniaca*), le griottier (*P. cerasus*), le prunier (*P. domestica*), le cerisier de Sainte-Lucie (*P. mahaleb*), le pêcher (*P. persica*) et le prunellier (*P. spinosa*), et quelle est leur évolution saisonnière, ces données ayant une grande importance dans les recherches biogénétiques. Ces données sont d'autre part susceptibles d'apporter des éléments intéressants dans le domaine de la biochimie comparée des espèces.

HYDRATES DE CARBONE

Les hydrates de carbone sont rapidement élaborés dans les feuilles par le mécanisme de la photosynthèse [16]. Tandis qu'une partie de ces hydrates de carbone est dégradée pour fournir à la plante une certaine énergie, une autre fraction est utilisée pour la biosynthèse d'un nombre considérable de substances.

Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que la formation des pigments flavonoïdes dépendait de la teneur en sucres de l'organisme végétal. Dès la fin du siècle dernier, Overton [73] montre que les plantes cultivées sur un milieu artificiel sucré synthétisent davantage de flavonoïdes. Lippmaa [64], en cultivant différentes plantes sur un milieu riche en hydrates de carbone obtient une augmentation de la teneur en anthocyanes et en caroténoïdes. Selon Lippmaa, les sucres favorisent la formation de ces pigments. Dans les feuilles d'*Ampelopsis hederacea* et de *Rosa canina*, Combes [24] a établi une corrélation entre la teneur en sucres et l'apparition des pigments anthocyaniques. Molish [70] pense également que la biosynthèse des anthocyanes dépend de l'accumulation de sucres dans la feuille. Il compare la formation d'anthocyanes avec celle de l'oxalate et du carbonate de calcium qui, au contraire des protéines, des sels de potassium et des phosphates, ne retournent pas dans le tronc avant la chute des feuilles. Gaumann [44] dans une étude systématique sur l'érable a observé une migration saisonnière des hydrates de carbone. Dans le courant de l'été, les sucres synthétisés par les feuilles se dirigent vers le tronc où ils s'y accumulent; au départ de la végétation, le tronc s'appauvrit en hydrates de carbone au profit des feuilles.

Les variations individuelles de chacun des hydrates de carbone au cours de la période végétative des feuilles sont par contre bien moins connues.

Nous étudierons les variations saisonnières de la teneur en hydrates de carbone des feuilles de merisier (*P. avium*), de prunier (*P. domestica*) et du cerisier de Sainte-Lucie (*P. mahaleb*), et nous envisagerons la relation entre ce métabolisme glucidique et la biosynthèse des molécules aromatiques.

I - CONDITIONS DE PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS VEGETAUX

Les conditions de prélèvement des échantillons végétaux ont une grande importance pour la reproductibilité du résultat des analyses des

différents constituants chimiques. D'une manière générale, les prélèvements ont été effectués sur des arbres relativement jeunes (10 ans au maximum) ayant poussé spontanément en plein champ. Les échantillons prélevés correspondent aux 3 ou 4 premières feuilles apparues sur un rameau. Au début de la végétation, les feuilles forment une touffe dans laquelle nous avons prélevé celles qui ont la plus grande taille. Par la suite, lorsque les rameaux se sont développés, il est facile de recueillir les premières feuilles formées qui sont situées à la base des rameaux. Il existe en effet un temps assez long entre la formation des premières et celle des dernières feuilles sur un même rameau et une variation progressive de leur constitution chimique. Les échantillons sont ramassés le matin vers 8 heures afin d'éviter les variations qui pourraient se produire à la suite d'un ensoleillement plus ou moins intense; dans ces conditions, la constitution chimique est relativement stabilisée. Guichard a montré effectivement que dans la vigne, les variations diurnes de la constitution chimique n'étaient pas négligeables[48].

II - DETERMINATION ANALYTIQUE DES HYDRATES DE CARBONE

La détermination chromatographique des sucres à partir d'un matériel végétal s'avère parfois délicate lorsqu'il s'agit de déceler de petites quantités de produits. Aussi avons-nous recherché une méthode analytique qui permette d'éliminer toutes les substances susceptibles de gêner la chromatographie sur papier des hydrates de carbone.

1/ Extraction et purification.

10 g de feuilles poids frais sont extraits 3 fois par l'alcool à 80° à chaud, d'abord par 150 ml, puis 100 ml et enfin 50 ml. L'extrait total est concentré sous pression réduite à 40° dès que possible afin d'éviter la transestérification de la chlorophylle qui gênerait la suite des opérations. On reprend à l'eau distillée, dans ces conditions la chlorophylle est en majeure partie insolubilisée. On filtre et l'on passe sur une résine d'Amberlite IR 120 (préalablement activée par l'acide chlorhydrique normal). Cette résine retient essentiellement les amino-acides [69]. Le filtrat est ensuite passé sur une colonne d'Amberlite anionique forte IRA 410 (préalablement activée par le carbonate de sodium à 5%) qui retient les anions, puis purifié sur une colonne de charbon.

Chromatographie sur charbon [27].

La chromatographie sur charbon permet de séparer les sucres des leucoanthocyanes et des glucosides flavoniques encore présents dans le filtrat. Pour cela, on lave environ 3 g de charbon actif par l'acide acétique pur, puis l'on rince à l'eau distillée. Le mélange pâteux est versé dans une colonne à chromatographie en évitant d'introduire des bulles d'air. Le filtrat de la résine d'Amberlite IRA 410 est versé sur la colonne de charbon. L'alcool éthylique à 20% permet une élution totale des sucres déposés sur la colonne, les leucoanthocyanes et les glucosides flavoniques restant fortement adsorbés sur le charbon. L'évaporation à sec sous vide fournit un précipité cristallin blanc d'hydrate de carbone. Une élution à l'eau distillée de la colonne de charbon ne fournirait pas une récupération complète des sucres, les dissacharides en particulier, ne sont élués que par un mélange hydroalcoolique.

2/ Identification des sucres.

Le résidu cristallin est dissous dans 5 ml d'eau, puis soumis à la chromatographie sur papier. Nous avons identifié dans les feuilles de meri-

sier, du prunier et du cerisier de Sainte-Lucie, le saccharose, le glucose et le fructose comme constituants les plus importants. Dans les feuilles de merisier, nous avons également identifié le xylose à une concentration appréciable (environ 0,3 % poids sec). La présence de xylose est intéressante à signaler car son existence à l'état libre dans les feuilles n'a été observée que très rarement [8].

Tableau I

Rf. chromatographiques des sucres dans différents solvants

	Solvant I	Solvant II	Solvant III	Solvant IV
Saccharose	0,14	0,13	0,20	0,00
Glucose	0,21	0,19	0,28	0,03
Fructose	0,30	0,24	0,34	0,05
Xylose	0,35	0,30	0,38	0,10

Solvant I : Butanol - ac. formique - eau (75 - 15 - 10)

Solvant II : Butanol - ac. acétique - eau (40 - 10 - 50)

Solvant III : Butanol - ac. propionique - eau - (70 - 20 - 10)

Solvant IV : Méthyl-éthylcétone - Ammoniaque conc. (99 - 1)

Il existe différents réactifs colorés permettant de révéler les sucres. Nous avons choisi :

- le réactif au naphtorésorcinol indiqué par Partridge [79] qui révèle en rouge le saccharose et le fructose. Le réactif est obtenu en mélangeant à parties égales les 2 solutions suivantes :

solution à 2‰ de naphtorésorcinol dans l'alcool à 95°

solution à 2‰ d'acide trichloracétique dans l'eau.

- le réactif au phtalate d'aniline de Partridge [80] qui révèle les aldoses en brun rouge. Ce réactif est obtenu en dissolvant 0,93 g d'aniline et 1,66 g d'acide phtalique dans 100 ml d'alcool à 80°. Nous avons remplacé le solvant butanol indiqué par Partridge par l'alcool éthylique dont l'emploi est moins désagréable.

3/ Dosage des sucres par chromatographie sur papier.

a) Chromatographie.

La solution contenant les sucres est portée à l'aide d'une micropipette sur la ligne de départ du chromatogramme (papier d'Arche n°302). On porte 10 taches les unes à côté des autres, au total 50 mm³ et l'on encadre par des témoins contenant un mélange de saccharose, de glucose et de fructose. On dépose aussi sur le chromatogramme, à l'aide de la micropipette 10 mm³ d'une solution témoin contenant les 3 sucres : saccharose, glucose et fructose (concentration 10%). L'élution et le dosage de ces sucres, en admettant que la récupération soit la même dans le cas des témoins et des solutions inconnues, permet d'établir une courbe de référence pour chacun d'eux.

Le chromatogramme permettant le dosage des sucres est représenté par la figure 1.

On dissout d'abord le phosphate et le tartrate dans 600 ml d'eau; on ajoute la soude puis le sulfate de soufre et le sulfate de soude préalablement dissous. Après un jour de repos, on filtre.

- IO_3K normal.

On ajoute 5 ml de cette solution à un litre de réactif de SOMOGYI.

- Solution d'iodure de potassium à 2, 5% stabilisé par une trace de CO_3Na_2 ;

- Acide sulfurique normal;

- Thiosulfate de sodium 0, 005 N.

A un litre, on ajoute 2 ml de soude à 10%.

- Empois d'amidon à 0, 5% d'amidon de riz.

Mode opératoire.

Le dosage du glucose est effectué sur 5 ml de l'éluat chromatographique. On introduit dans chaque tube 5 ml exactement de la solution de SOMOGYI contenant 5 ml d' IO_3K par litre; on recouvre d'une boule en verre les tubes à essais et l'on place au bain-marie bouillant très fortement. Après 25 minutes d'ébullition, on refroidit les tubes et l'on ajoute lentement 0,5 ml de la solution d'iodure de potassium puis rapidement 1, 5 ml d'acide sulfurique 2 N et l'on bouche immédiatement. On titre par $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ en présence d'empois d'amidon.

Dosage du saccharose, fructose par la méthode de BARRENSCHEEN

[2].

Principe.

Formation avec l'orcinol en milieu fortement acide de composés furfuriques avec les cétooses ou les pentoses.

Réactifs.

Solution A	HCl	d 1, 19	1 litre
	$\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$		0, 068 g

Orcine : 2 g.

Le réactif de BARRENSCHEEN ne se conserve pas; au moment de l'emploi on ajoute 100 mg d'orcinol à 50 ml de la solution A.

Mode opératoire.

Les prises d'essais peuvent contenir jusqu'à 0, 2 mg de sucres dans 5 ml. de solution. On ajoute 5 ml exactement de réactif de BARRENSCHEEN.

Les tubes sont recouverts et placés au bain-marie bouillant fortement pendant 10 minutes. On arrête la réaction en les plongeant dans l'eau froide. La coloration développée est rouge pour le saccharose et le fructose. Les mesures colorimétriques sont effectuées au spectrophotomètre de Beckman, modèle DU à 485 m μ pour le saccharose et le fructose.

La précision de la méthode est de $\pm 4\%$.

III - METABOLISME DES HYDRATES DE CARBONE

Dans les feuilles de merisier, de prunier et de cerisier de Sainte-Lucie, la période printanière de fructification est caractérisée par un accroissement de la teneur en glucose et en fructose (cf. tableau 2).

Dans *P. avium* et *P. domestica*, l'accroissement de la teneur en fructose des feuilles au cours de la fructification est beaucoup plus important que celui du glucose. Dans le cas de *P. mahaleb*, l'augmentation de la teneur de ces deux sucres est sensiblement du même ordre.

Tableau II

Variation saisonnière des glucides dans les feuilles de merisier, de prunier et de cerisier de Sainte-Lucie,
Résultats exprimés en mg/gr de poids sec.

		25 AVRIL	17 MAI	28 JUIN	16 JUILLET	7 SEPT.
<i>P. avium</i>	Saccharose	2,9	2,3	2,0	4,3	6,5
	Glucose	3,0	4,6	4,1	3,6	1,9
	Fructose	2,7	5,0	4,8	4,0	2,0
<i>P. domestica</i>	Saccharose	4,1	3,7	5,8	8,0	8,9
	Glucose	3,3	5,6	5,0	4,5	3,9
	Fructose	2,9	6,0	5,1	3,8	2,5
<i>P. mahaleb</i>	Saccharose	5,4	4,8	4,3	6,0	7,6
	Glucose	3,3	4,6	6,5	4,7	3,3
	Fructose	2,9	4,0	5,3	3,8	2,8

Le saccharose présent dans les feuilles suit une courbe sensiblement inverse de celles du glucose et du fructose. La biosynthèse du saccharose précédant normalement celles du glucose et du fructose [16], nous devons donc admettre une activité invertasique particulièrement grande à cette période. Cette utilisation massive du saccharose doit être attribuée en partie à l'édification de l'armature lignocellulosique du végétal et aussi aux besoins de la fructification. Dans les merises, en particulier, à tous les stades de leur développement, nous avons décelé principalement du glucose et du fructose, et en quantité plus faible du saccharose et du xylose. Dans les vieilles feuilles, les quantités de glucose et de fructose sont nettement plus faibles. Néanmoins, il est intéressant de noter que la quantité totale des sucres conserve une valeur élevée tout au long de la végétation même dans les feuilles âgées.

Cette forte teneur en sucres que nous observons dans les feuilles âgées permet de faire une corrélation avec l'apparition des pigments anthocyaniques à cette époque comme l'ont déjà remarqué Combes et Molish chez d'autres espèces.

La méthode des traceurs appliquée à cette période de la végétation permettrait d'abord de préciser si l'accumulation des sucres dans les vieilles feuilles correspond à une synthèse toujours importante ou bien s'il y a un ralentissement de la migration de ces substances dans la sève élaborée, puis de vérifier le rôle des hydrates de carbone dans la formation des pigments anthocyaniques.

II

ACIDES AMINÉS

La teneur en acides aminés libres d'un organe végétal est le résultat d'un équilibre dynamique entre les différentes synthèses et dégradations qui s'effectuent au sein de cet organe. Plusieurs expériences à l'aide d'isotopes radioactifs ont en effet mis en évidence qu'il existe une synthèse et une dégradation permanentes chez les végétaux [118]. Ces expériences ont montré que dans les jeunes cellules végétales, le taux de protéines augmente, puis varie peu dans les cellules à l'état de maturité et diminue dans les cellules âgées. On peut donc en déduire que dans les premières étapes de la végétation, les biosynthèses seront généralement prépondérantes, tandis que dans les feuilles âgées, l'augmentation de la teneur en acides aminés sera principalement due aux dégradations protéiques. A l'heure actuelle, on a relativement peu de renseignements sur cet équilibre dynamique qui résulte de l'anabolisme et du catabolisme azoté chez les végétaux.

Certains amino-acides aromatiques présentent un intérêt particulier par leur rôle de précurseurs dans la biosynthèse des pigments flavoniques ou de la lignine. Neish et ses collaborateurs [106] ont montré que la phénylalanine et la tyrosine pouvaient participer à la biosynthèse de la lignine chez les graminées et à la biogénèse des flavonoïdes chez le sarrazin [114].

I - METHODE D'ANALYSE DES ACIDES AMINES

1/ Extraction et purification.

Les acides aminés sont fixés sur une résine cationique d'Amberlite IR 120, puis élués à l'ammoniaque normale (cf. p. 5). L'éluat est concentré sous pression réduite pour chasser l'excès d'ammoniaque. Le volume de la liqueur à chromatographier est ramené à 5 ml à partir de 10 g de feuilles fraîches.

2/ Dosage des acides aminés.

La solution contenant les acides aminés est chromatographiée en deux dimensions sur un papier Arches n°302 de dimension 25 x 25 cm. Le développement dans la première dimension est réalisé après 8 heures de chromatographie descendante dans le mélange butanol-acide formique-eau (75 - 15 - 10).

On développe ensuite dans la deuxième dimension avec le mélange phénol-eau (80-20). Après séchage du chromatogramme dans un courant d'air chaud, la révélation des acides aminés s'effectue par trempage dans une solution acétonique de ninhydrine à 2%. Les principaux acides aminés révélés occupent la position schématisée dans la figure 2.

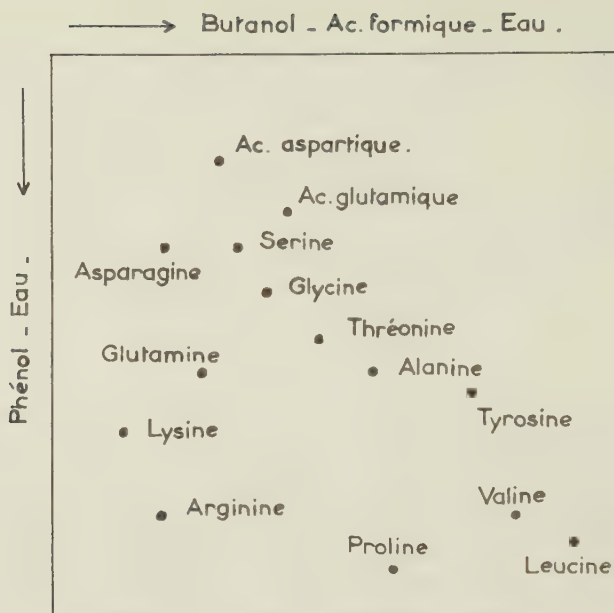


Figure 2 - Schéma du chromatogramme des amino-acides.

L'asparagine, la glutamine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine, la sérine, la valine et la leucine sont dosés par une méthode colorimétrique décrite par Mortreuil et Khouvine [71]. La proline est dosée selon la méthode de comparaison visuelle des taches de Acher, Jutisz et Fromageot [1].

II - METABOLISME DES ACIDES AMINES

Au cours d'une étude sur les bourgeons végétatifs de merisier [28], nous avons mis en évidence que ceux-ci possèdent une composition en acides aminés assez différente de celle des feuilles et très variable depuis le moment de leur formation jusqu'à leur éclosion. Pendant toute la période de végétation des bourgeons, nous avons trouvé un taux de proline très élevé par rapport aux autres acides aminés. Les acides aminés basiques qui existent en quantité importante au début du mois d'octobre disparaissent dans le courant de l'hiver et sont probablement intégrés en grande partie dans les protéines. Parmi les acides aminés aromatiques, la tyrosine et la phénylalanine ont été identifiées dans les bourgeons [27]. L'asparagine et la glutamine sont rapidement utilisées en automne, mais par contre réapparaissent dès le mois de février, bien avant l'éclosion, au moment où l'on commence à percevoir le gonflement des bourgeons. Dans les toutes jeunes feuilles, on observe une forte teneur en acides aminés libres qui décroît progressivement au cours du développement.

Le même phénomène se reproduit dans les feuilles de *P. domestica* et de *P. mahaleb*. C'est dans les jeunes feuilles que l'on observe la plus forte

teneur en amide aspartique ainsi qu'en proline (cf. tableau III). Cet accroissement de l'asparagine au moment de l'éclosion des bourgeons n'est pas sans analogie avec les phénomènes biochimiques qui accompagnent la germination des graines. Ainsi, au cours de la germination des graines de lupin, il y a une diminution de la teneur en protéines de la graine, tandis qu'il apparaît une grande quantité d'asparagine et aussi de glutamine [20]. La teneur en amides aspartique et glutamique décroît rapidement lorsque les feuilles de lupin se développent. Dans le cas des bourgeons, l'augmentation de la teneur en asparagine n'est peut-être pas uniquement due à une protéolyse. Nous avons observé en effet, la richesse de la sève brute du merisier en acide aspartique, tandis que cette même sève était pauvre en acide glutamique [27]. L'apport d'acide aspartique par la sève brute favorise certainement la formation d'asparagine, la biosynthèse de cet acide aminé pouvant s'effectuer à partir de l'acide aspartique par amidification directe en présence d'A. T. P. par une réaction analogue à la formation de la glutamine [36].

Ac. aspartique + NH₃ + A. T. P. $\longrightarrow$ Asparagine + A. D. P. + P. inorganique.

L'asparagine et la glutamine jouent un rôle important dans le métabolisme protéique, car ils peuvent céder une partie de leur azote aux différents acides cétoniques par transamination [38].

Pendant la période de fructification, ces amides diminuent rapidement, l'asparagine en particulier; dans les merises en croissance nous avons observé une quantité importante d'asparagine qui provient vraisemblablement des feuilles. La quantité de proline décroît également dans les feuilles de merisier au cours de leur développement, tandis que l'on observe parallèlement un accroissement très net de la teneur de cet amino-acide dans les merises.

Tableau III

Variations saisonnières des acides aminés dans les feuilles
de *P. avium*, *P. domestica* et *P. mahaleb*

Résultats exprimés en microgrammes par gramme de poids sec.

		6 MARS	15 AVRIL	2 JUIN	15 JUIL.	29 AOÛT	10 OCT.
Asparagine	<i>P. avium</i>	860	440	70	traces	0	0
	<i>P. domestica</i>	570	250	traces	0	0	0
	<i>P. mahaleb</i>	720	310	50	traces	0	0
Glutamine	<i>P. avium</i>	340	160	60	28	33	46
	<i>P. domestica</i>	260	120	44	18	traces	traces
	<i>P. mahaleb</i>	410	190	95	65	30	30
Ac. aspartique	<i>P. avium</i>	130	44	30	24	15	10
	<i>P. domestica</i>	83	41	25	30	22	30
	<i>P. mahaleb</i>	108	57	29	10	16	27
Ac. glutamique	<i>P. avium</i>	130	112	98	72	60	47
	<i>P. domestica</i>	95	80	66	54	50	45
	<i>P. mahaleb</i>	170	195	124	90	96	105

Tableau III (suite)

		6 MARS	15 AVRIL	2 JUIN	15 JUIL.	29 AOÛT	10 OCT.
Proline	P. avium	610	170	60	46	52	40
	P. domestica	430	130	47	28	traces	traces
	P. mahaleb	490	205	76	70	58	45
Alanine	P. avium	126	115	92	88	70	90
	P. domestica	149	120	105	96	90	180
	P. mahaleb	170	148	120	118	135	240
Serine	P. avium	160	120	40	30	38	118
	P. domestica	89	50	32	36	46	62
	P. mahaleb	112	65	50	48	62	90
Valine	P. avium	58	18	traces	12	17	87
	P. domestica	40	27	18	13	20	32
	P. mahaleb	49	31	20	18	28	74
Leucine	P. avium	50	16	traces	15	20	56
	P. domestica	41	10	13	traces	20	27
	P. mahaleb	63	17	10	12	17	58

L'alanine conserve une teneur relativement forte tout au long de la végétation, elle augmente sensiblement dans les feuilles jaunissantes de même que la serine, la valine et la leucine (cf. figures 3 et 4). Comment interpréter l'augmentation de la teneur de certains amino-acides dans les feuilles âgées ? On peut penser que les feuilles sénescentes ont une faible capacité de synthèse des protéines qui provoque une accumulation d'acides aminés. Cependant, certaines expériences à l'aide de radioéléments tendent à montrer que la diminution du taux de protéines dans les feuilles âgées ne provient pas d'une baisse de capacité de biosynthèse protéique [118]. Dans le cas du merisier, nous avons observé une diminution de la teneur en azote protéique des feuilles de 3,09 à 1,62% (poids sec) entre le mois de juillet et le mois d'octobre. La dégradation protéique ne fait ici aucun doute et permet d'expliquer l'accroissement de la teneur en amino-acides libres des feuilles de merisier, au cours de leur vieillissement.

Dans le groupe des amino-acides aromatiques, seule la tyrosine a été trouvée en petite quantité à l'état libre dans les jeunes feuilles de P. avium, P. domestica et P. mahaleb. Dans les feuilles adultes, il n'est pas possible de la déceler par chromatographie sur papier. Cette molécule doit être particulièrement labile et rapidement métabolisée dans les feuilles. La phénylalanine semble être également très labile puisqu'elle n'apparaît pas sur les chromatogrammes. Stewart, Brown et Neish [106] ont montré que la tyrosine pouvait participer à la biosynthèse de la lignine, probablement après une transamination qui fournirait l'acide p. hydroxyphénylpyruvique. D'autre part, la conversion rapide de l'acide p. hydroxycinnamique en quercétine chez le sarrazin suggère qu'il peut exister un pool métabolique entre les substances du type phénylpropane C₆ - C₃.

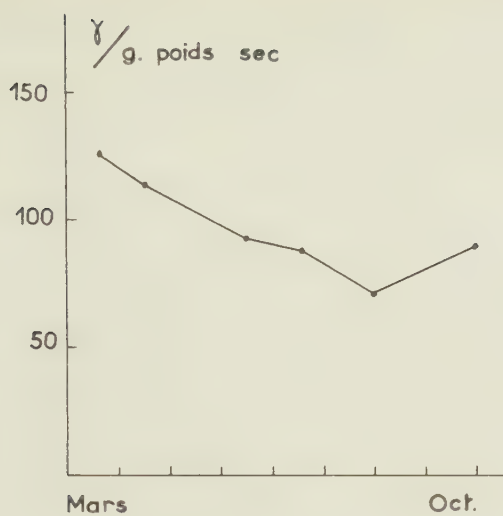


Figure 3 - Variation saisonnière de l'alanine dans les feuilles de merisier. Résultats exprimés en microgrammes par gramme de poids sec.

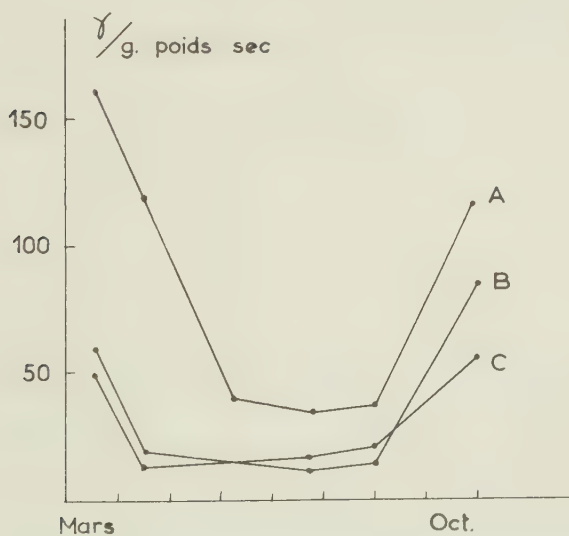


Figure 4 - Variation saisonnière de la sérine (A), de la valine (B) et de la leucine (C) dans les feuilles de merisier. Résultats exprimés en microgrammes par gramme de poids sec.

$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH} = \text{CH} - \text{COOH}$	Acide p. hydroxycinnamique
$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{COOH}$	Acide p. hydroxyphényllactique
$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CO} - \text{COOH}$	Acide p. hydroxyphénylpyruvique
$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CHNH}_2 - \text{COOH}$	Tyrosine

Les réactions d'interconversion de ces composés sont analogues dans leur principe à celles responsables de l'interconversion des acides fumarique, malique, oxalacétique (et aspartique) du cycle de Krebs.

En résumé, nous avons observé une forte teneur en acides aminés libres dans les jeunes feuilles, principalement en asparagine et en glutamine. La teneur de ces amides diminue rapidement au cours de la croissance pour devenir très faible dans les feuilles âgées. D'autres acides aminés, la sérine, la valine et la leucine ont une variation différente et leur teneur passe par un minimum lorsque les feuilles sont adultes.

Parmi les acides aminés aromatiques, la tyrosine a été mise en évidence en quantité très faible ce qui permet de penser que sa consommation enzymatique est très rapide.

Les bourgeons de merisier présentent aussi une évolution importante de leur constitution chimique entre le mois d'octobre et le mois de mars. Cette évolution est caractérisée par une diminution de la teneur en asparagine, en glutamine et en acides aminés basiques au cours de l'automne, puis par une augmentation de la quantité de ces deux amides dès le mois de février bien avant l'éclosion des bourgeons.

III

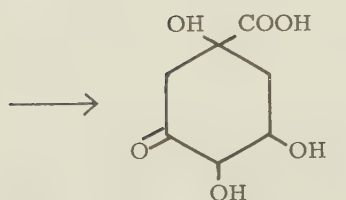
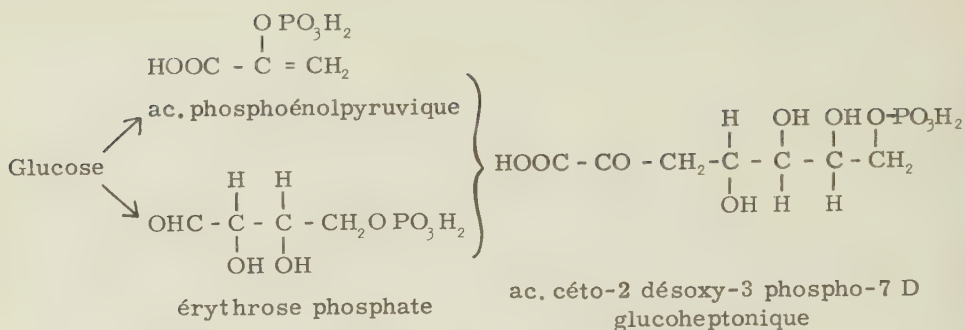
ACIDES ORGANIQUES

Les acides organiques occupent une place importante dans le métabolisme intermédiaire des végétaux. Certains constituent les différentes étapes du cycle de Krebs à partir duquel peuvent se former un certain nombre d'acides aminés. D'autres acides organiques dérivent aussi du métabolisme des hydrates de carbone, en particulier l'acide pyruvique et l'acide quinique, ce dernier acide ayant une structure voisine de l'acide shikimique qui est un précurseur des molécules aromatiques. L'étude des acides organiques chez les végétaux est assez délicate car ceux-ci existent en partie à l'état libre, et en partie sous forme de sels ou de combinaisons plus ou moins solubles. D'autre part, certains acides tels que les acides cétoniques et l'acide chlorogénique, ne sont pas très stables aux différents traitements chimiques et leur détermination nécessite de grandes précautions. Nous étudierons séparément les acides alcools, les acides cétoniques et l'acide chlorogénique.

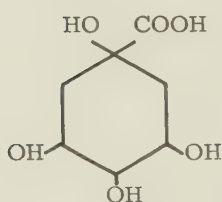
I - ACIDES ALCOOLS

Certains acides alcools tels que l'acide malique, l'acide citrique ou l'acide tartrique sont très répandus dans le monde végétal, soit à l'état libre, soit à l'état de sels alcalins ou alcalino-terreux, principalement dans les fruits et dans les feuilles. D'autres acides, tels que l'acide quinique ou shikimique se rencontrent moins souvent.

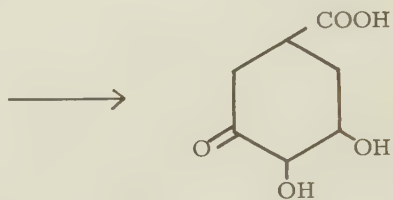
L'acide quinique est un acide alicyclique important par sa position intermédiaire entre le métabolisme aliphatique et aromatique des plantes. On le rencontre dans les fruits [57] où il accompagne l'acide shikimique dont la structure est voisine. Davis a montré que l'acide shikimique est un intermédiaire dans la biosynthèse du noyau aromatique chez les micro-organismes [33]. L'acide shikimique dérive de l'acide céto-2 désoxy-3 phospho-7 D glucoheptonique. Ce sucre acide en C₇ provient de la condensation de l'erythrose 4 phosphate et de l'acide phosphoénolpyruvique [105]. L'erythrose phosphate est issue du glucose par le cycle des pentoses phosphates, tandis que l'acide phosphoénolpyruvique est fourni par la glycolyse.



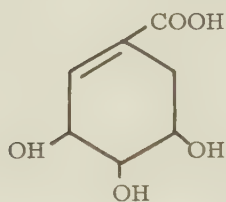
ac. déhydroquinique



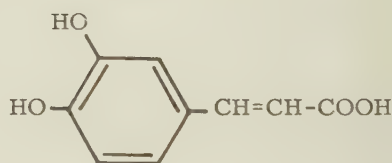
ac. quinique



ac. déhydroshikimique



ac. shikimique



ac. caféique

Récemment, Plouvier [84] [85] a isolé l'acide shikimique à partir des feuilles de 20 espèces de gymnospermes et de 7 espèces d'Anacardiacees. Cet acide se rencontre d'ailleurs aussi bien dans les jeunes pousses que dans les pousses plus âgées.

L'acide quinique est également présent dans les feuilles de gymnospermes. Il a été identifié par Plouvier [84] dans 26 espèces de gymnospermes et sa teneur est plus forte dans les jeunes pousses que dans les vieilles pousses. Carles [18] a observé la présence d'acide quinique dans les plantules de blé et de lupin ainsi que dans les feuilles de maïs. Les

jeunes feuilles de maïs sont aussi plus riches en acide quinique que les feuilles sénescentes.

L'isolement des acides alcools peut s'effectuer selon différentes techniques. L'extraction par l'eau suivie d'une précipitation à l'acétate de plomb est employée par Guichard [49]. Swain [108] traite les fruits par l'alcool à 80° à froid tandis que Bryant [15] opère avec le même solvant à chaud. Bentley [7] préconise l'emploi d'eau acidifiée par l'acide sulfurique. L'extraction par un solvant neutre est parfois plus longue que par un solvant acidifié étant donné la faible solubilité de certains sels alcalino-terreux [49].

1/ Détermination analytique.

a) Extraction et purification.

Nous opérons sur 5g de feuilles fraîches broyées au mortier en présence de sable fin et de 30 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N. Le mélange est laissé une heure à température du laboratoire puis centrifugé. On effectue encore deux extractions par l'eau distillée au bain-marie bouillant pendant 15 minutes chaque fois. Les extraits sont réunis puis concentrés à sec sous pression réduite. Le résidu est repris par 30 ml d'alcool à 80°. Un certain nombre d'impuretés, en particulier les protéines, sont insolubilisées par ce traitement. Néanmoins, la fraction soluble contient des sucres, des acides aminés et des pigments qu'il convient d'éliminer. Pour cela, les acides organiques sont fixés sélectivement sur une résine anionique forte du type Amberlite IRA 410 préalablement activée par le carbonate de sodium selon la technique de Bryant et Overell [15]. L'activation à l'aide du carbonate de sodium permet d'éviter les artefacts qui se produisent lorsque la résine est activée par la soude caustique. Hulme [56] a en effet constaté une dégradation des sucres au passage sur une résine anionique forte activée par la soude avec formation d'acide lactique et glycolique. La solution hydro alcoolique contenant les acides organiques est versée sur une colonne IRA 410. La colonne est rincée avec 100 ml d'eau distillée puis les acides organiques élués par 100 ml d'une solution de carbonate d'ammoniaque normale. L'éluat est concentré à sec sous pression réduite à chaud; le carbonate d'ammoniaque est décomposé tandis que les acides organiques restent à l'état de sels d'ammonium.

b) Détermination qualitative des acides organiques.

Les acides organiques sont identifiés par chromatographie bidimensionnelle sur papier. Les sels d'ammonium des acides organiques sont dissous dans l'eau et déposés sur un chromatogramme en vue d'une séparation bidimensionnelle. La première dimension est développée dans le mélange éthanol-ammoniaque concentrée-eau (80 - 5 - 15). Après séchage du chromatogramme, on développe dans le mélange propanol - eucalyptol - acide formique - eau (30 - 50 - 20 - 15). Le chromatogramme est ensuite séché au four à 100° pendant une heure, puis on pulvérise une solution de vert de bromocrésol à 0,02% en milieu alcoolique, le réactif étant alcalinisé jusqu'à coloration bleue par quelques gouttes de soude décinormale. En utilisant cette méthode, nous avons décelé dans les feuilles de prunus en quantité appréciable, l'acide citrique, l'acide malique et l'acide quinique. Les R_f obtenues sont indiquées dans le tableau IV.

Tableau IV

Valeur des Rf. des acides citrique, malique et quinique

Solvant	Ac. citrique	Ac. malique	Ac. quinique
I	0,2	0,9	0,62
II	0,31	0,35	0,05

Solvant I : éthanol - ammoniacque concentrée - eau (80 - 5 - 15)

Solvant II : propanol - eucalyptol - acide formique - eau (50 - 50 - 20 - 15)

Ces trois acides ont été dosés au fur et à mesure de la croissance des feuilles. Les acides cétoniques existent en faible quantité dans les feuilles, mais la sensibilité de cette méthode chromatographique n'est pas suffisante. L'acide chlorogénique est partiellement dégradé dans le mode d'extraction précédent. Les acides cétoniques et l'acide chlorogénique seront donc analysés séparément par des méthodes appropriées.

c) Détermination quantitative des acides citrique, malique et quinique.

Ces acides sont dosés après chromatographie sur papier par une méthode titrimétrique [49].

Les acides organiques sous forme de sels ammoniacaux obtenus après élution de la résine d'Amberlite IRA 410 sont repris par 1 ml d'eau, puis l'on dépose une partie de cette solution sous forme d'un trait de 8 cm sur une feuille de papier à chromatographie. On développe le chromatogramme dans le mélange solvant II pendant 24 heures selon la technique ascendante. Le chromatogramme est alors séché à l'air chaud pendant 3 heures, puis on pulvérise un nuage de réactif iodure-iodate de potassium (10% - 5%). Les zones brunes correspondant aux acides malique, citrique et quinique sont découpées puis plongées dans 5 cm³ de solution iodure-iodate de potassium dans un tube à essai rodé. L'iode libéré est titré en retour. Pour cela, on ajoute un excès d'hyposulfite de sodium (2 cm³ centinormale) et l'on titre par l'iode N/200 en présence d'empois d'amidon. Le témoin ne doit pas dépasser 0,2 ml d'iode N/200. L'iode est libéré selon l'équation :



2/ Métabolisme des acides alcools.

Des modifications saisonnières importantes dans la teneur en acides organiques des feuilles ont été mises en évidence; ces modifications sont d'ailleurs parallèles dans toutes les espèces examinées (cf. tableau V). La teneur en acide quinique et en acide citrique diminue dans les feuilles au cours de leur développement tandis que l'acide malique s'accumule dans les vieilles feuilles de toutes les espèces examinées.

Dans les vieilles feuilles, l'accumulation d'acide malique provient vraisemblablement du fait que la déshydrogénase malique assurant la transformation en acide oxalacétique est peu active (cf. schéma 1). D'une manière générale, on peut considérer que l'accumulation ou la disparition d'un acide organique dépend des vitesses relatives de production et de consommation

enzymatiques, celles-ci étant déterminées par les conditions physiques extérieures, par le degré de développement de la plante et aussi par les facteurs héréditaires.

Tableau V

Variations saisonnières des acides quinique, citrique et malique dans les feuilles de merisier, d'abricotier, de prunier, de griottier et de cerisier de Sainte-Lucie
Résultats exprimés en mg par g de poids sec.

		16 AVRIL	28 JUIN	29 AOÛT	DÉBUT OCTOBRE
Prunus avium	Ac. quinique	3,1	1,2	1	1,07
	Ac. citrique	3,2	1,1	1,2	0,87
	Ac. malique	2	2,9	3,1	4,6
Prunus armeniaca	Ac. quinique	5,3	3,9	3	2,8
	Ac. citrique	0,9	0,8	0,20	0,20
	Ac. malique	0,8	1,5	1,7	2,1
Prunus domestica	Ac. quinique	5,3	3,6	3	2,1
	Ac. citrique	1,5	0,9	0,6	traces
	Ac. malique	1,2	1,3	2	2,6
Prunus cerasus	Ac. quinique	4,4	3,2	2,3	1,8
	Ac. citrique	2,8	1,2	1,5	0,7
	Ac. malique	1,7	3,2	3,4	3,4
Prunus mahaleb	Ac. quinique	1,9	1	1	0,7
	Ac. citrique	1,3	1	0,5	traces
	Ac. malique	2	3,1	4,6	5,4

L'accumulation d'acide malique dans le merisier, l'abricotier, le prunier, le cerisier de Sainte-Lucie et le griottier traduit donc une similitude dans le comportement enzymatique de ces différentes espèces. Il ne semble pas d'ailleurs que ce phénomène soit spécifique du genre prunus, puisque le maïs par exemple, présente également une accumulation d'acide malique dans ses feuilles âgées.

La formation importante d'acide citrique dans les jeunes feuilles coïncide avec la diminution de l'asparagine. L'asparagine peut conduire à la formation d'acide citrique par l'intermédiaire de l'acide aspartique et de l'acide oxalacétique.

La forte teneur en acide quinique dans les jeunes feuilles peut être le reflet de l'énorme activité synthétique à ce stade : synthèse des précurseurs de la lignine, des amino-acides aromatiques pour l'élaboration des protéines. Une production abondante d'acide déhydroquinique entraînerait accessoirement une formation importante d'acide quinique, si l'on admet un mécanisme de biosynthèse analogue à celui que l'on trouve chez *Aerobacter* [32]. La formation importante d'acide quinique dans les jeunes feuilles semble être un phénomène assez général puisqu'il a également été observé chez les gymnospermes [84] et les monocotylédones [18].

Hydrate de carbone

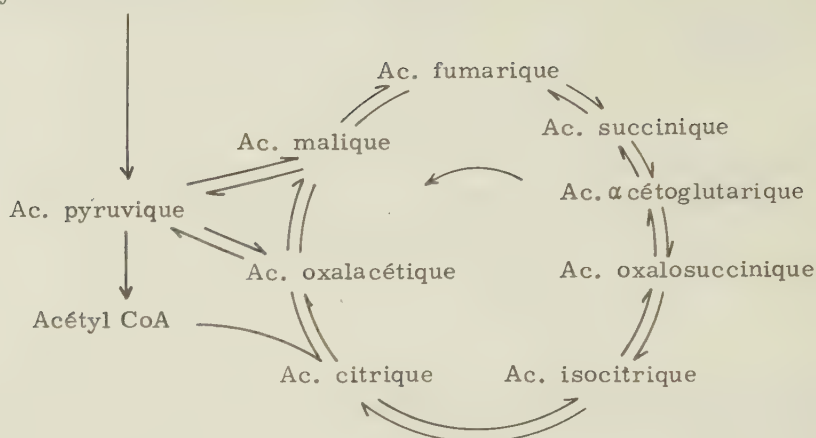


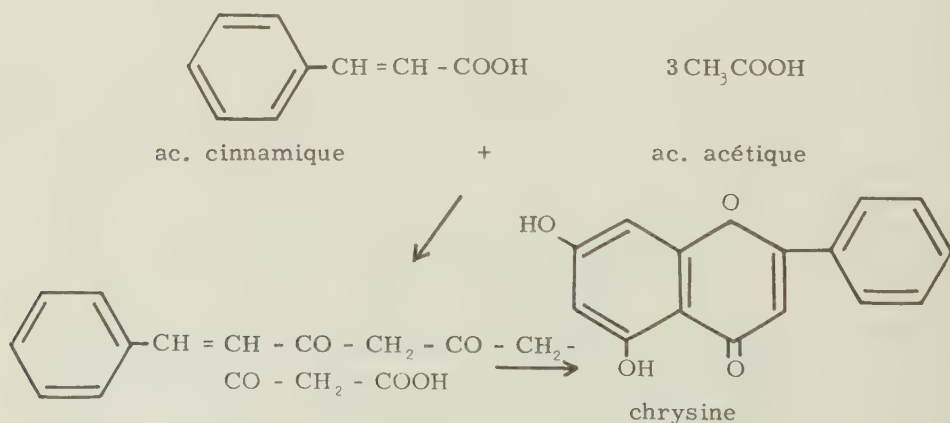
Schéma 1 - Cycle de Krebs

L'acide shikimique, par contre, n'a pas pu être décelé dans les feuilles de Prunus, sa transformation en composés aromatiques devant être très rapide dans les espèces étudiées.

II - ACIDE ACETIQUE

1/ Métabolisme de l'acide acétique radioactif.

L'acide acétique existe chez les végétaux, principalement sous forme de radical acétyl combiné au coenzyme A. L'acétyl coenzyme A apparaît dans la dégradation des glucides par l'intermédiaire de l'acide pyruvique (cf. schéma 1). C'est un métabolite intermédiaire très labile susceptible de s'incorporer dans plusieurs schémas biologiques, en particulier dans le cycle de Krebs, dans la formation des acides gras ou des stérols. Selon une hypothèse biogénétique proposée par Birch [11], les flavones (la chrysine par exemple) pourraient résulter de la condensation de 3 molécules d'acide acétique avec l'acide cinnamique.



Si cette hypothèse était exacte, en d'autres termes, s'il existait une voie directe capable de conduire de l'acide acétique aux hétérocycles oxygénés, nous devrions assister à une incorporation du carbone marqué (^{14}C) administré à une plante sous forme de $\text{CH}_3 - ^{14}\text{COOK}$, dans les flavones synthétisés par cette plante.

Le fait que les flavones sont normalement élaborés par les feuilles de merisier a été établi précédemment par Platel et Mentzer [61] qui ont montré que ces dérivés se rencontrent surtout dans ces organes à l'état de glucosides plus solubles dans l'eau que les aglycones libres, et par conséquent, plus aptes à migrer avec la sève élaborée.

Nous avons donc essayé d'incorporer de l'acétate de potassium radioactif à des feuilles de merisier afin de suivre son métabolisme.

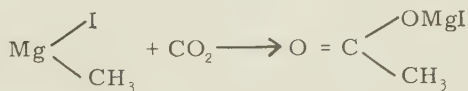
Protocole expérimental.

L'administration d'une molécule radioactive à une plante présente un certain nombre de difficultés qu'il nous a fallu tout d'abord surmonter dans le cas particulier envisagé. Nous pensions utiliser de jeunes plants de merisier en pots auxquels nous aurions pu injecter les substances à étudier. Mais il avait été démontré par ailleurs qu'une telle technique n'est pas bonne car la radioactivité reste souvent localisée dans les environs immédiats du point d'injection. L'application à la surface de la feuille, suivie d'une absorption par les stomates a été également abandonnée car nous pouvions prévoir dans ce cas une dilution trop grande de la radioactivité qui se serait certainement répartie presque uniformément dans l'ensemble de la plante.

Une technique simple et efficace, tout au moins pour les essais préliminaires, est basée sur le fait que des feuilles isolées de merisier peuvent être maintenues en survie pendant au moins 48 h si l'on prend soin de plonger leur pétiole dans un milieu liquide convenable. D'autre part, il est possible de contrôler leur activité physiologique par la mesure du liquide absorbé en fonction du temps.

a) Synthèse de l'acétate de potassium radioactif⁽¹⁾.

On traite le carbonate de baryum radioactif par l'acide perchlorique. Il y a libération de CO_2 que l'on fait réagir sur l'iodure de méthylmagnésium :



Le composé magnésien est hydrolysé par l'acide sulfurique 6 N. L'acide acétique est entraîné par la vapeur d'eau puis neutralisé par une solution de KOH N/10. Le rendement de la préparation est de 85%. On évapore à sec. L'acétate de potassium obtenu possède une radioactivité de 0,845 mc/mmole, soit 8,62 $\mu\text{c}/\text{mg}$.

(1) Synthèse réalisée par P. Vercier et A. Ville.

b) Absorption de l'acétate radioactif.

On recueille 10 feuilles de merisier dont on plonge le pétiole dans 10 tubes à hémolyse contenant chacun 7 mg d'acétate de potassium dissous dans 2 ml d'eau. Chaque tube contient une activité correspondant à 62,9 μ c. Le pétiole des feuilles de merisier reste plongé pendant 48 h dans la solution radioactive, puis on retire les feuilles et on les lave soigneusement à l'eau distillée. L'expérience est effectuée en milieu aérobie et à la lumière naturelle, à une température oscillant autour de 20°.

c) Etude des composés flavoniques et des anthocyanes.

On traite 2 feuilles de merisier par l'acide chlorhydrique à 3% pendant une heure au bain-marie bouillant. Après filtration, l'extrait étheré contenant les composés flavoniques est chromatographié sur papier. L'activité est négligeable. On note simplement une faible activité au front du solvant.

L'extraction au butanol et la chromatographie de cet extrait permettent de mettre en évidence une tache de cyanidine non marquée et une traînée brune radioactive au front du solvant. Il s'agit vraisemblablement de produits de condensation entre les sucres et certains acides aminés formés au cours de l'hydrolyse.

d) Etude des sucres, acides organiques, acides aminés.

8 feuilles de merisier sont extraites 5 fois par l'alcool à 80° (le résidu possède une radioactivité assez sensible due probablement au marquage de la cellulose ou de la lignine). Les extraits alcooliques sont réunis, dilués deux fois et passés sur une résine cationique sulfonique "amberlite IR 120" qui retient essentiellement les acides aminés. Le filtrat est ensuite versé sur une résine anionique "amberlite IR 410" qui retient les acides organiques; les sucres apparaissent dans le filtrat de cette deuxième résine.

α) Hydrates de carbone.

La révélation au phosphate d'aniline du chromatogramme fait apparaître 5 taches correspondant au raffinose, au saccharose, au glucose, au

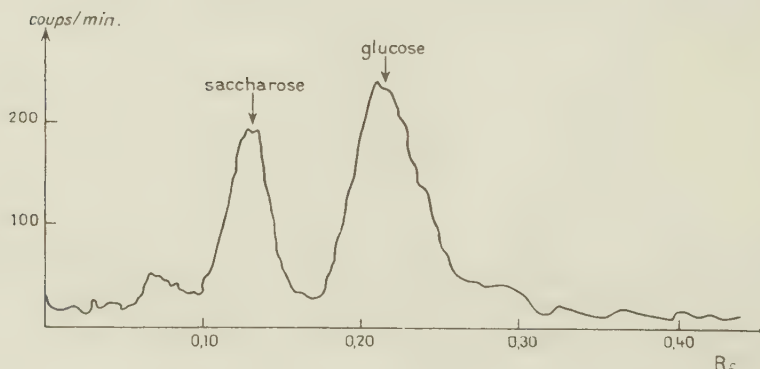


Figure 5 - Radiogramme des sucres. Circuit : G. M. TGC 2. Mesco : Inertie 80 s. Sensibilité 1.

fructose et au xylose. Les taches du saccharose et du glucose sont nettement radioactives. La figure 5 représente le radiogramme obtenu.

β) Acides organiques.

Les acides organiques fixés sur "Amberlite IR 410" sont élués par l'acide chlorhydrique normal. Les acides cétoniques sont transformés en dinitro-2, 4 phénylhydrazones.

Cette fraction cétonique n'est pas radioactive.

Les acides organiques non cétoniques sont chromatographiés dans le solvant phénol-eau-acide formique (80 - 19 - 1). Seule la tache d'acide malique présente une radioactivité sensible au compteur.

γ) Acides aminés.

L'éluat ammoniacal de la résine amberlite IR 120 contient les acides aminés. La chromatographie en une dimension de cette fraction dans le solvant phénol-eau (80 - 20) montre principalement deux taches radioactives : celle de l'acide glutamique et celle de la proline (cf. figure 6).

La chromatographie en deux dimensions permet une séparation convenable des acides aminés radioactifs. On développe la première dimension à l'aide du solvant : butanol-acide formique-eau (75 - 15 - 10) puis la deuxième dimension par le mélange : phénol-eau (80 - 20). Après séchage du chromatogramme à l'air chaud, les acides aminés sont révélés par une solution de ninhydrine à 0,2% dans l'acétone acidifiée par 1% d'acide acétique. Le chauffage à 40° pendant une dizaine de minutes provoque l'apparition des taches d'acides aminés. La figure 7 schématise la photographie du chromatogramme ainsi obtenu. Le chromatogramme est ensuite mis en contact pendant 10 jours avec une pellicule radiographique "Kodirex". Le radio-autogramme obtenu est représenté par la figure 8. Les principales taches radioactives sont l'acide glutamique, la proline et l'acide γ-amino-

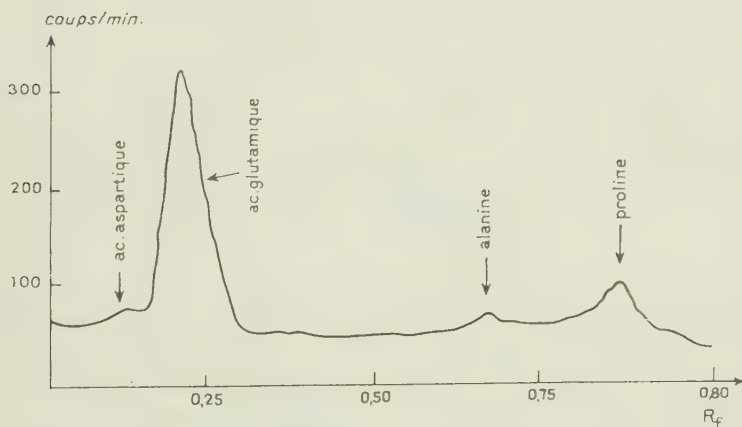


Figure 6 - Radiogramme des acides aminés.

butyrique; viennent ensuite l'acide aspartique, l'asparagine et la glutamine. Les acides aminés suivants sont très peu radioactifs ou ne le sont pas du tout : alanine, valine, leucine, sérine, glycolle, thréonine.

δ) Chromatographie préparative de l'acide glutamique marqué.

La totalité de l'extrait des acides aminés est déposée sur le papier chromatographique sous la forme d'un grand trait en vue d'isoler l'acide glutamique. On développe tout d'abord le chromatogramme dans le mélange phénol-eau (80 - 20). La mise en contact de la chromatographie avec une pellicule radiographique permet de situer exactement la zone correspondant à l'acide glutamique. On découpe alors la partie intéressante; on l'extrait

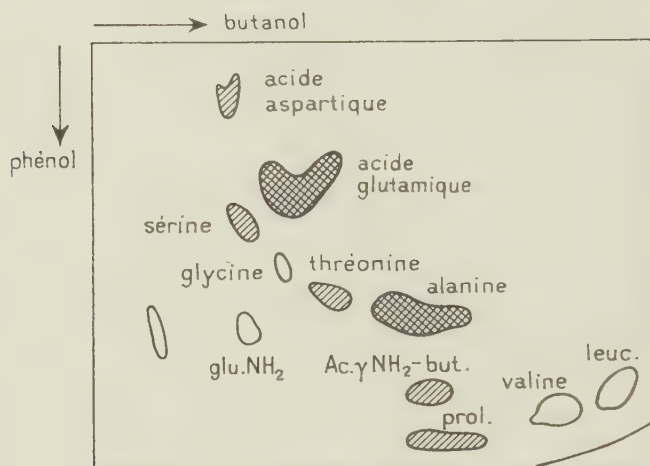


Figure 7 - Schéma du chromatogramme des acides aminés.

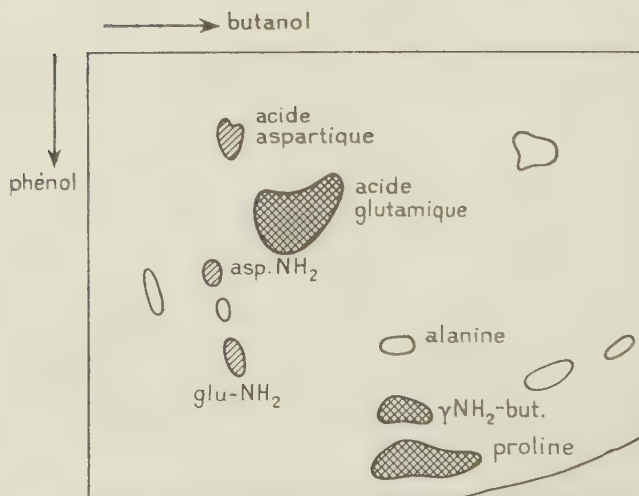


Figure 8 - Schéma du radioautogramme des acides aminés.

par l'alcool à 80°. L'acide glutamique ainsi récupéré contient de la sérine qui a sensiblement le même Rf dans le solvant phénolique. Une deuxième chromatographie toujours sous la forme d'un grand trait permet dans le solvant butanol-acide formique-eau (75 - 15 - 10) d'éliminer la sérine.

L'acide glutamique est localisé par le même procédé radiographique puis élué par l'alcool. La concentration à sec de l'éluat nous donne 2,3 mg d'acide glutamique dont l'activité spécifique est de 3,5 μ c/mmole.

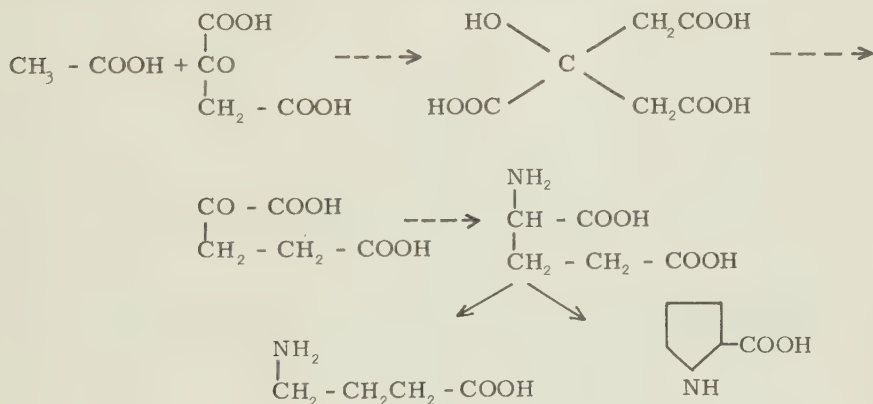
Cette activité spécifique nous paraît intéressante à signaler car elle représente seulement une dilution de 1/250 par rapport à l'acétate de potassium radioactif de départ (845 μ c/mmole).

L'acide glutamique est ensuite dilué par 200 mg d'acide non radioactif extrêmement pur. On obtient après recristallisation dans l'eau 150 mg d'acide glutamique. La radioactivité spécifique de cet acide reste la même au cours de 3 recristallisations successives.

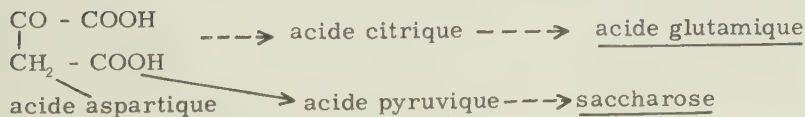
2/ Discussion.

On se rend compte, d'après ces résultats, que la radioactivité de l'acétate de potassium administré se retrouve surtout dans l'acide glutamique et dans les corps qui lui sont biochimiquement apparentés : glutamine, proline, acide γ -aminobutyrique, acide aspartique, c'est-à-dire dans les composés directement issus du cycle tricarboxylique de Krebs. Il est remarquable de noter que la plupart des autres acides aminés, issus de mécanismes biogénétiques différents, ne sont que très peu radioactifs ou même ne le sont pas du tout.

L'intégration de l'acide acétique dans le cycle biogénétique de la feuille de merisier s'effectue donc très probablement de la façon suivante :



ou encore : $2 \text{CH}_3\text{COOH} \quad \text{---} \rightarrow$



On peut évidemment se demander pourquoi les divers diacides non azotés du cycle tricarboxylique ne se laissent pas caractériser sur le chromatogramme; ce fait est dû sans doute à la présence de systèmes enzymatiques très actifs qui transforment ces diacides au fur et à mesure de leur apparition.

L'acide glutamique et ses proches parents ne sont plus transformés probablement parce que les enzymes responsables de leur métabolisme doivent être absents ou exister à une trop faible concentration.

Le fait que les dérivés flavoniques ne sont pas radioactifs montre que pour l'élaboration des hétérocycles oxygénés *in vivo*, le merisier a sans doute besoin de précurseurs plus complexes que les molécules issues directement de l'intégration de l'acide acétique dans le cycle de Krebs. Comme a en effet, montré que l'acide cinnamique est un excellent précurseur des dérivés flavoniques [25]; ces résultats confirment une hypothèse précédemment émise par Mentzer [67] quant à l'origine du noyau aromatique latéral des pigments flavoniques.

En ce qui concerne le noyau phloroglucine, les résultats que nous avons obtenus ne mettent pas en évidence une polycondensation de l'acide acétique pour aboutir à cette structure. Cela est certainement dû au fait que l'action de la molécule marquée (48 heures) est insuffisante par suite des conditions mêmes de l'expérience effectuée sur des feuilles vertes en survie en milieu liquide. Neish [107] a montré que chez le sarrasin, l'acide acétique s'incorporait dans la quercétine 24 heures après l'administration d'acétate de potassium; la biosynthèse de la quercétine dans cette plante doit être bien plus rapide que dans le cas du merisier. Les feuilles de sarrasin contiennent environ 5% de quercétine [107], tandis que dans les feuilles de merisier, la teneur de ce constituant est de l'ordre de 1% (cf. quatrième partie). Grisebach [47] a depuis apporté une preuve définitive quant à l'intégration de l'acide acétique dans le noyau phloroglucine. Par administration "*in vitro*" d'acétate de sodium radioactif ^{14}C au chou rouge, Grisebach a montré que la radioactivité se localisait sur le noyau A de la cyanidine.

D'autres expériences comportant l'administration conjointe d'acide acétique radioactif et d'acide cinnamique radioactif ont été entreprises par Ville ⁽¹⁾. Ainsi le précurseur en C_2 rencontrant le précurseur convenable pour aboutir aux dérivés flavoniques, pourra donner naissance à de tels composés.

Notons enfin que la technique ci-dessus peut être considérée comme une véritable synthèse biochimique de l'acide glutamique radioactif.

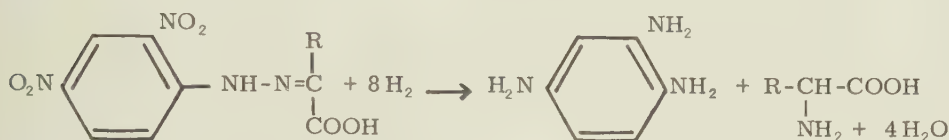
III - ACIDES CETONIQUES

Les acides cétoniques occupent une place de choix dans les chaînes de réactions qui conduisent aux molécules les plus compliquées de la matière vivante. On les trouve, en effet, au carrefour du métabolisme hydrocarboné et azoté. La détection de ces acides dans la sève de merisier nous a déjà permis de montrer que l'élaboration de ces substances est liée principalement au mécanisme de la photosynthèse [27]. Cependant, la faible teneur des milieux végétaux en acides cétoniques par rapport aux acides malique ,

(1) Thèse de Doctorat en cours.

citrique et quinique que l'on rencontre en quantité beaucoup plus importante, ne permet pas d'en effectuer une chromatographie directe sur papier, ces 3 acides interférant de façon gênante. La chromatographie des dinitro 2-4 phénylhydrazones des acides cétoniques accroît la sensibilité de détection. Cette méthode a néanmoins l'inconvénient de fournir souvent dans les conditions opératoires 2 hydrazones correspondant aux formes cis et trans de la liaison C = N. La présence de ces deux isomères dont la structure a été élucidée par Isherwood rend délicate l'interprétation des chromatographies sur papier [59].

Towers, Thompson et Steward ont décrit [113] une réduction catalytique de ces dinitro 2-4 phénylhydrazones sous pression en présence de noir de palladium. Il est ainsi possible d'aboutir aux acides aminés correspondants suivant la réaction :



La chromatographie de tels acides aminés permet d'identifier les acides cétoniques correspondants.

Nous avons donc effectué un dosage colorimétrique total des hydrazones d'acides cétoniques puis réalisé une réduction en acides aminés de ces hydrazones afin de les identifier avec une plus grande sensibilité; la sensibilité de détection des acides aminés sur un chromatogramme étant de l'ordre du microgramme tandis que celle des dinitro 2-4 phénylhydrazones est voisine de 20 microgrammes.

1/ Détermination analytique.

a) Dosage colorimétrique des acides cétoniques totaux.

α) Extraction et purification.

Les feuilles fraîches (10 g) sont extraites par l'alcool à 80° à froid après broyage en présence de sable fin. On effectue 3 extractions par 150 ml puis 100 ml et 80 ml d'alcool. Dans le cas des acides cétoniques, ce mode d'extraction plus doux donne les mêmes résultats que le traitement acide utilisé précédemment pour les acides alcools. Les solutions alcooliques sont alors réunies, la moitié de cet extrait est versée sur une colonne échangeuse d'anions du type Amberlite IRA 400 (l'autre moitié est conservée en vue du dosage de l'acide chlorogénique). Les acides cétoniques sont fixés sur la colonne puis élués par 100 ml d'acide chlorhydrique 2N.

β) Formation des dinitro 2-4 phénylhydrazones et dosage.

L'éluat chlorhydrique contenant les acides cétoniques est additionné de 2 ml d'une solution à 1% de dinitro 2-4 phénylhydrazine dans l'acide sulfurique concentré. On laisse 30 minutes à la température du laboratoire, puis l'on extrait 2 fois par 50 ml d'acétate d'éthyle. Les phases solvantes sont réunies et extraites 3 fois par 30 ml de bicarbonate de sodium en solution aqueuse à 5%. Les phases aqueuses sont réunies puis lavées par 20 ml d'acétate d'éthyle. On acidifie jusqu'à pH 2,0 à l'aide d'acide chlorhydrique 2N et l'on extrait la totalité des hydrazones des acides cétoniques par 20 ml, puis 15 ml et 10 ml d'acétate d'éthyle. On complète à 50 ml et l'on mesure

l'absorption au spectrophotomètre Beckman à 350 mμ. Toutes les dinitro 2-4 phénylhydrazones des acides cétoniques absorbent fortement la lumière à cette longueur d'onde en milieu alcoolique neutre.

Tableau VI

Variations saisonnières des acides cétoniques totaux dans les feuilles.
Résultats exprimés en microgrammes d'acide pyruvique
par gramme de poids sec.

	16 AVRIL	28 JUIN	29 AOÛT	3 OCTOBRE
Prunus armeniaca	52	77	65	69
Prunus avium	46	62	53	50
Prunus cerasus	40	60	58	55
Prunus domestica	63	89	75	63
Prunus mahaleb	48	68	51	46

Les quantités d'acides cétoniques totaux décelées dans les feuilles sont très faibles. Ces molécules sont des intermédiaires à brève existence et rapidement transformées dans l'organisme. A aucun moment de la végétation il n'y a de blocage des systèmes enzymatiques au niveau de ces acides comme celui que nous avons observé pour l'acide malique.

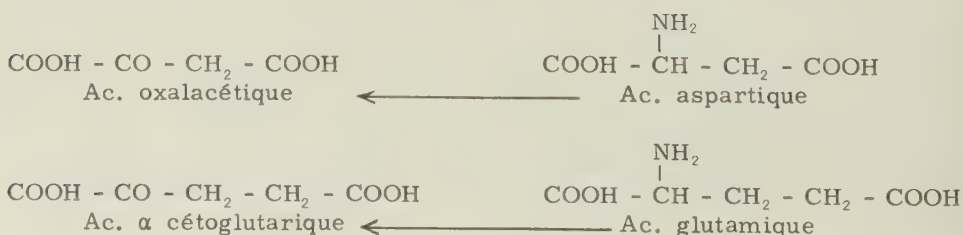
b) Réduction des hydrazones en acides aminés.

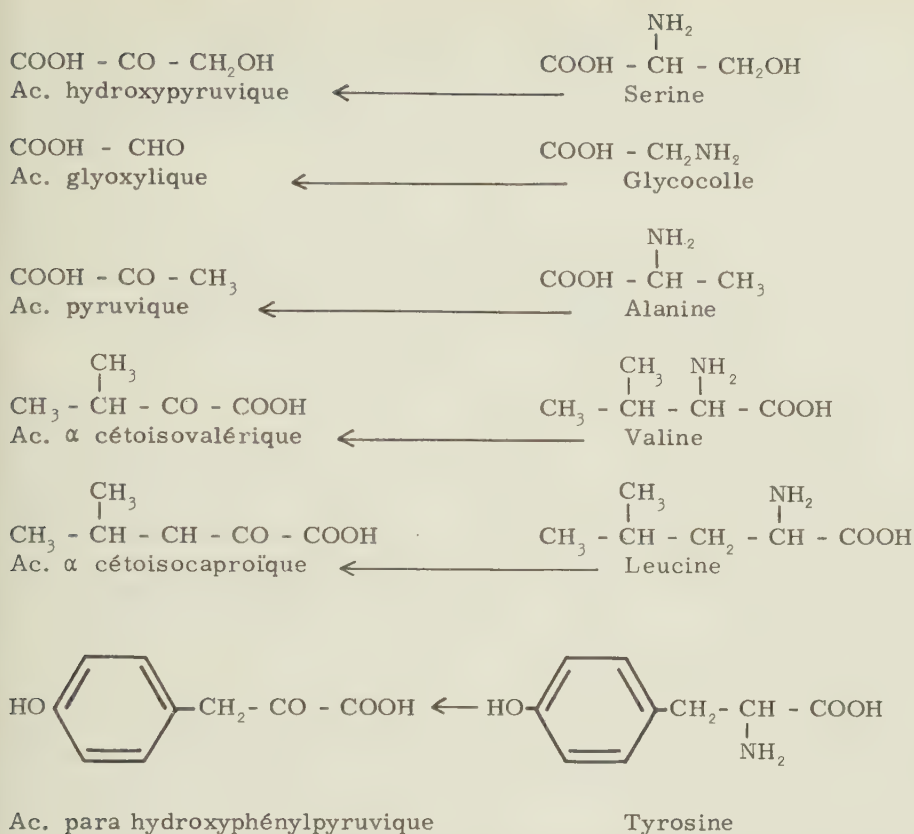
Nous avons effectué la réduction catalytique des dinitro 2-4 phénylhydrazones en présence d'oxyde de platine [110] à température et pression ordinaires; une élévation de pression n'est pas nécessaire en employant ce catalyseur. La réduction est complète en 20 minutes et s'observe par la décoloration de la solution.

2/ Métabolisme des acides cétoniques.

La chromatographie bidimensionnelle des acides aminés obtenus après réduction est effectuée avec les solvants déjà cités. Nous avons identifié dans les feuilles de l'abricotier, du merisier, du griottier, du prunier et du cerisier de Sainte-Lucie 7 amino-acides qui sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la serine, le glycocolle, l'alanine, la valine et la leucine. La tyrosine a été identifiée dans les jeunes feuilles de merisier, du griottier et du prunier.

D'après les chromatogrammes obtenus, nous pouvons admettre dans les feuilles de ces Prunus la présence des acides cétoniques correspondant aux acides aminés identifiés :

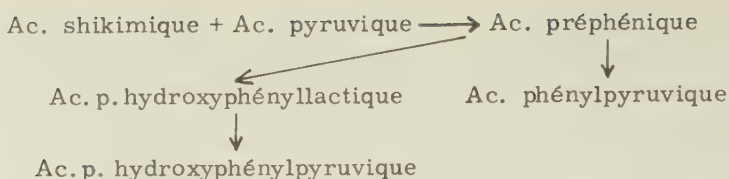




L'acide pyruvique reste sensiblement constant tout au long de la végétation. Par contre, l'acide α céto glutarique et l'acide oxalacétique diminuent dans les feuilles âgées des différentes espèces. Ces deux acides font partie du cycle de Krebs et la diminution de leur teneur dans les feuilles reflète peut-être un ralentissement du fonctionnement de ce cycle. L'acide α cétoisovalérique augmente sensiblement dans les feuilles âgées et doit provenir de son amino-acide correspondant la valine. La teneur de cet amino-acide augmente dans les feuilles sénescents et l'importance des phénomènes de dégradation à cette époque peut expliquer la présence de l'acide α cétoisovalérique.

L'acide hydroxypyruvique augmente également dans les vieilles feuilles. Cet acide cétonique correspond à la serine, mais ne provient vraisemblablement pas de cette dernière dont la désamination s'accompagne de déshydratation et conduit à l'acide pyruvique [43]. Par contre, le schéma de la glycolyse permettrait d'expliquer la présence de cet acide cétonique [95].

L'acide p. hydroxyphénylpyruvique est le seul acide cétonique aromatique du type $\text{C}_6 - \text{C}_3$ décelable dans les feuilles. La présence de cet acide est particulièrement intéressante car c'est l'une des premières molécules aromatiques formées dans l'organisme végétal. L'acide p. hydroxyphénylpyruvique proviendrait de l'acide shikimique par l'intermédiaire de l'acide préphénique, si l'on admet un schéma analogue à celui proposé par Davis [34].



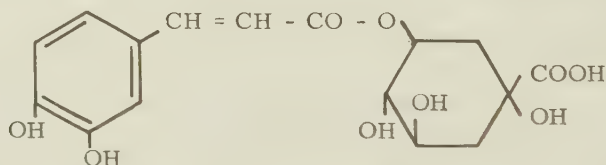
Nord et Schubert [72] ont d'autres part prouvé que dans la canne à sucre cet acide marqué sur le carboxyle s'intégrait dans la lignine. La plus grande partie de la radioactivité de l'acide p. hydroxyphénylpyruvique se retrouve d'ailleurs dans la lignine. Cet acide est donc un intermédiaire dans la voie biosynthétique qui conduit de l'acide shikimique à la lignine.

Est-il possible d'envisager l'acide parahydroxyphénylpyruvique comme précurseur des pigments flavonoïdes ?

Brown et Neish ont montré que l'acide cinnamique, l'acide phénylpyruvique et l'acide p. hydroxycinnamique sont d'excellents précurseurs de ces pigments. Aussi il n'est pas impossible de penser que l'acide p. hydroxyphénylpyruvique s'intègre dans le squelette des flavonoïdes puisque la biogénèse de ces pigments s'effectue également bien à partir de dérivés du type phénylpropane non hydroxylé ou monohydroxylé sur le noyau phényl.

IV - ACIDE CHLOROGENIQUE

L'acide chlorogénique est l'ester quinique de l'acide caféïque. Cet acide est largement distribué chez les plantes supérieures, puisque d'après une recherche de Gorter [46] sur 227 espèces appartenant à 71 familles, 92 en contiennent.



Acide chlorogénique

L'acide chlorogénique joue un rôle protecteur vis-à-vis des champignons parasites et des virus. Quackenbush et ses collaborateurs [86] ont montré que l'acide chlorogénique est responsable de la résistance à l'infection de la pomme de terre par *Helminthosporium carbonum*. Schaal [99] remarque également que l'acide chlorogénique se trouve dans les cellules adjacentes au péricarde des tiges de pommes de terre et que les variétés les plus résistantes sont très riches en acide chlorogénique. Les produits d'autoxydation de l'acide chlorogénique et caféïque inhibent la croissance "in vitro" de *Streptomyces scabies* [100]. "In vivo", une action enzymatique forme peut-être des produits d'oxydation très actifs qui inhibent la croissance des champignons parasites. Martin et Morel [65] ont observé une accumulation de substances phénoliques dont l'acide chlorogénique chez les végétaux atteints de maladies à virus.

1/ Identification de l'acide chlorogénique.

La solution alcoolique des feuilles précédemment obtenue dans l'étude

des acides cétoniques est concentrée à sec sous pression réduite, puis la chlorophylle est extraite à l'éther de pétrole. Une séparation de l'acide chlorogénique sur résines anioniques n'est pas convenable par suite d'une altération de cet acide à leur contact. Le résidu est donc repris par l'alcool absolu et chromatographié directement en présence d'un échantillon de référence.

Tableau VII

Valeurs des Rf. de l'acide chlorogénique et fluorescence
en lumière ultra-violette

	ACIDE CHLOROGÉNIQUE	SOLUTION EXAMINÉE	FLUORESCENCE	FLUORESCENCE AVEC NH_4OH
Solvant I	0,56	0,56	bleu	vert jaune
Solvant II	0,77	0,77	bleu	vert jaune
Solvant III	0,61	0,61	bleu	vert jaune

Solvant I : Acide acétique - eau (2 - 98)

Solvant II : Acide acétique - eau (15 - 85)

Solvant III : Acétate d'éthyle - acide formique - eau (10 - 2 - 3).

Une microsaponification de l'acide chlorogénique par la potasse à 10% pendant 30 minutes permet d'obtenir les acides caféïque et quinique que l'on identifie par chromatographie sur papier.

Dosage chromatographique de l'acide chlorogénique.

Une quantité connue de l'extraitalcoolique est déposée sur un chromatogramme. Après 10 à 12 heures de développement dans le mélange acide acétique-eau (15 - 85), la zone correspondant à l'acide chlorogénique est décelée en lumière ultra-violette puis découpée et éluee par l'alcool à 95°. Dans le solvant ac. acétique - eau (15 - 85), l'acide chlorogénique n'interfère pas avec les autres substances polyphénoliques. La mesure de l'absorption spectro-photométrique à 330 millimicrons (maximum d'absorption) permet le dosage comparativement à une quantité connue d'acide chlorogénique.

2/ Métabolisme de l'acide chlorogénique.

Tableau VIII

Variations saisonnières de l'acide chlorogénique
Résultats exprimés en mg/g de poids sec

	18 MAI	16 JUILLET	13 OCTOBRE
Prunus armeniaca	30	28	20,2
Prunus avium	3,4	3,1	1,4
Prunus Cerasus	3,8	2,8	1,8
Prunus domestica	25,8	23	12,6
Prunus mahaleb	0,6	0,4	0,4

La teneur maximum en acide chlorogénique s'observe dans les jeunes feuilles. Cet acide doit se former très rapidement dans les feuilles à partir de l'acide caféïque et de l'acide quinique car l'acide caféïque libre n'apparaît pas en quantité appréciable. Dans les feuilles jaunissantes, les quantités d'acide chlorogénique sont dans tous les cas plus faibles. La proportion de cet acide est fort différente selon les espèces d'un même genre puisque dans l'abricotier on trouve jusqu'à 30 mg/g poids sec tandis que dans le cerisier de Sainte-Lucie elle n'excède pas 0,60 mg/g.

La concentration exceptionnellement élevée en acide chlorogénique dans les feuilles de *P. armeniaca* et *P. domestica* est probablement responsable de leur grande résistance aux infections par rapport aux autres espèces.

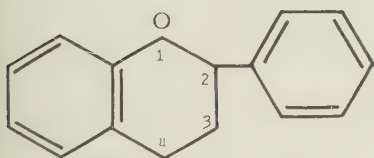
Il est intéressant de noter également que *P. armeniaca* et *P. domestica* qui ont les plus fortes teneurs en acide chlorogénique appartiennent à la section *Prunophores* du genre *Prunus*, et que cette section, comme nous le verrons dans la quatrième partie, est la plus pauvre en dérivés du type flavonol.

Du point de vue biogénétique, les travaux de Neish [114] ont montré la difficulté d'incorporer des dérivés dihydroxylés du type caféïque dans le schéma de la formation des flavonoïdes. Ceci permet de penser que l'acide chlorogénique qui est un ester caféïque, n'est pas un précurseur valable pour la biosynthèse de ces pigments, mais peut-être un produit final du métabolisme dont le rôle biochimique apparaît néanmoins comme très important.

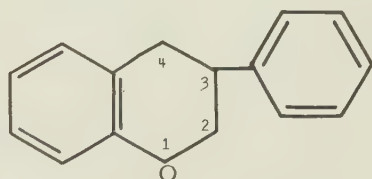
IV

PIGMENTS FLAVONOÏDES

Parmi les pigments du règne végétal, un groupe très répandu est constitué par les dérivés du type benzopyrannique dont le squelette fondamental est celui du phényl-2 benzopyrane ou du phényl-3 benzopyrane.

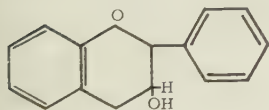


Phényl-2 benzopyrane

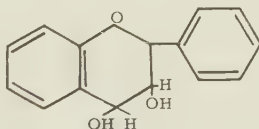


Phényl-3 benzopyrane

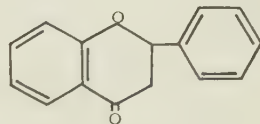
L'oxydation ou la déshydrogénation en position 3 ou 4 conduit à différents types de pigments.



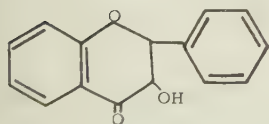
Catéchine



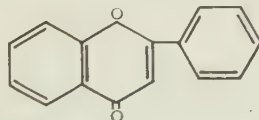
Leucoanthocyane



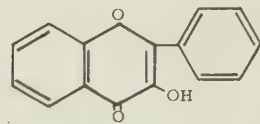
Flavanone



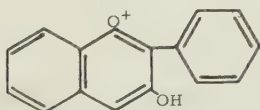
Flavanonol



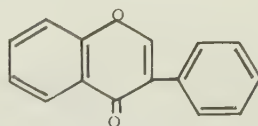
Flavone



Flavonol



Anthocyane



Isoflavone

Ces pigments, que l'on appelle "Flavonoïdes", se rencontrent fréquemment dans les fleurs et les fruits auxquels ils donnent des teintes variées [62 bis, 74, 98, 102].

Chez les plantes ligneuses, c'est cependant dans les parties les moins vivantes du végétal qu'ils s'accumulent, c'est-à-dire principalement dans les cœurs de bois. Les espèces du genre *Prunus* sont très riches en pigments flavonoïdes et ont déjà suscité un certain nombre de recherches dans ce domaine. Dans le cœur de bois de merisier (*P. avium*), Mentzer et ses collaborateurs ont isolé et identifié 12 substances de nature flavonique :

la dihydroxy-5, 7 flavone	chrysine [68]
l'hydroxy-5 méthoxy-7 flavone	tectochrysine [68]
la dihydroxy-5, 7 flavanone	dihydrochrysine [68]
l'hydroxy-5, méthoxy-7 flavanone	dihydrotectochrysine [68]
la dihydroxy-5, 4' méthoxy-7 flavanone	sakuranetine [68]
le trihydroxy-5, 7, 4' flavanone 3 ol	aromadendrine [78]
le tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavanone 3 ol	taxifoline [77]
le dihydro-5, 7 flavanone 3 ol	pinobanksine [77]
le dihydroxy-5, 4' méthoxy-7 flavanone 3 ol	méthyl-7 aromadendrine [22]
le tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavonol	quercétine [68]
le tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavane 3 ol	D (+) catéchine [78]
la dihydroxy-5, 7 méthoxy-8 flavanone	dihydrowogonine [21]

Aucune autre espèce de ce genre ne s'est d'ailleurs révélée jusqu'à présent d'une aussi grande complexité chimique. L'étude de la sève élaborée du merisier nous a par ailleurs montré que l'élaboration de ces substances est liée en partie tout au moins, au mécanisme de la photosynthèse dans les feuilles [27]. Nous allons rechercher ici quelles sont les molécules accumulées en quantité appréciable par les feuilles de merisier (*P. avium*) et de quelques espèces du même genre et quelle est l'évolution saisonnière de la teneur de ces pigments. Ces données sont en effet intéressantes afin de pouvoir étudier la biogénèse et les interrelations de ces pigments à la période la plus favorable.

I - D (+) CATECHINE

En 1832, Esenbeck [38] a extrait du Gambir catechu une substance qu'il appelle "acide du catechu". En 1902, plusieurs formules étaient déjà proposées pour cette substance désormais appelée catechine [82]. Freudenberg [42] en 1921, montre que la catéchine du Gambir est dextrogyre et en donne une formule définitive.

A la suite de ces premières recherches, la D (+) catéchine a été identifiée dans plusieurs espèces végétales. Collot et Rabate [23] la découvrent dans l'écorce de pêcher, Hasegawa [50, 51] dans les feuilles de *Chamoecyparis pisifera*, et dans le bois de *Prunus spinulosa*. Schmidt [101] l'isole de la cupule des chataîgnes. Zaprometov [120] montre qu'elle est un constituant important des feuilles de thé. Bate Smith [3] a observé qu'elle se rencontre principalement chez les plantes ligneuses.

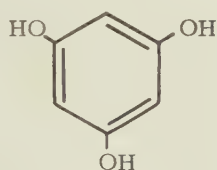
1/ Identification de la D (+) catéchine.

A partir d'un extrait aqueux de bourgeons de merisier, nous avons tout d'abord mis en évidence par chromatographie sur papier, une substance très réductrice vis-à-vis du nitrate d'argent et qui fournissait par

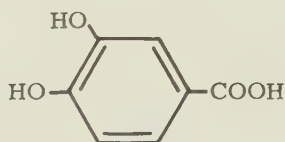
fusion alcaline de la phloroglucine et de l'acide protocatéchique, donc probablement de type "Flavonoïde". Cette substance réductrice se trouvait également présente dans une fraction hydrosoluble d'un extrait de bois de merisier. Nous avons donc effectué l'isolement de ce Flavonoïde à partir du cœur de bois et des bourgeons, puis déterminé sa structure. Cette même substance a été identifiée dans 6 autres espèces de *Prunus*.

a) Isolement de la D (+) catéchine à partir du cœur de merisier.

Un kilo de cœur de merisier réduit en poudre est soumis à trois macérations successives en présence de 5 litres d'éther chaque fois. La durée de chaque macération doit être de 48 heures au minimum. Les solutions éthérées réunies sont évaporées au bain-marie et le résidu sirupeux (200 ml environ) est épuisé plusieurs fois de suite avec 50 ml d'eau distillée; la fraction aqueuse est soumise au vide de la trompe pendant une à 2 heures en vue d'éliminer complètement l'excès d'éther dissous dans l'eau. La solution légèrement trouble est filtrée puis saturée de chlorure de sodium et extraite au moyen d'acétate d'éthyle aussi longtemps que ce solvant se colore en jaune. La couche organique est évaporée sous vide à la température ordinaire et le résidu est recristallisé 3 fois dans un minimum d'eau distillée. On obtient ainsi des cristaux blancs fondant à 175° peu solubles dans l'eau froide mais très solubles à chaud, solubles également dans l'alcool éthylique et l'acétone. Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ est de +18° dans un mélange à parties égales d'acétone et d'eau. La fusion alcaline des cristaux en présence de potasse caustique pendant 5 minutes à 230° selon la méthode de Maurice et Mentzer [66] libère le phloroglucinol et l'acide protocatéchique qui sont identifiés par chromatographie sur papier.



Phloroglucinol



Acide protocatéchique

Le spectre ultra-violet de ce flavonoïde présente un minimum à 250 mμ et un maximum à 280 mμ. L'extinction $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1,37 \times 10^2$.

Analyse élémentaire :

calculé pour $C_{15}H_{16}O_7$	C. p.	100	58,44	H. p.	100	5,23
trouvé	C. p.	100	58,95	H. p.	100	5,41

Le dérivé pentaacétylé obtenu par acétylation à froid, au moyen d'anhydride acétique en présence de pyridine [54], fond à 132° au bloc Kofler, après recristallisation dans l'alcool à 95% $[\alpha]_D = +37,5^\circ$ dans le chloroforme.

Analyse élémentaire du dérivé acétylé :

calculé pour $C_{20}H_{24}O_{11}$	C. p.	100	60,00	H. p.	100	4,83
trouvé	C. p.	100	60,04	H. p.	100	4,85

Le flavonoïde donne une coloration verte avec le chlorure ferrique; cette coloration vire au rouge par addition d'une solution de carbonate de sodium à 5%. Avec le nitrate d'argent ammoniacal, il donne une coloration

brun noir, avec la paranitraniline diazotée, il donne une coloration brun jaune. Oxydé par le persulfate de potassium en milieu sulfurique selon la technique de Lavollay et Vignau [62], cette substance aboutit à un colorant ayant le même maximum d'absorption que la cyanidine (545 mμ).

Toutes ces propriétés sont celles de la D (+) catéchine.

Les valeurs des Rf. chromatographiques (cf. tableau XII) correspondent avec celles données dans la littérature pour la D (+) catéchine.

Le spectre d'absorption infra-rouge de la D (+) catéchine présente une transparence très nette entre $3\,000\text{ cm}^{-1}$ et $1\,660\text{ cm}^{-1}$. La zone comprise entre $1\,600\text{ cm}^{-1}$ et $1\,000\text{ cm}^{-1}$ absorbe fortement la lumière. Les bandes d'absorption se situent à 3,0 microns; 6,2; 6,55; 6,85; 7,35; 7,8; 8,45; 8,75; 9,0; 9,25; 9,70; 10,25; 10,9; 11,5; 12,1; 13,05; 13,70; 15,0. On remarque l'absence de la bande d'absorption due au groupement carbonyle $C=O$ qui est située à 6,0 microns dans le cas des flavones et flavonols et à 6,1 microns dans le cas des flavanones et flavanonols [58], (cf. figure 9).

b) Isolement de la D (+) catéchine à partir des bourgeons de merisier.

100 g de bourgeons de merisier secs sont épuisés par l'éther de pétrole puis par l'alcool bouillant. On concentre l'extract alcoolique jusqu'à consistance sirupeuse, puis l'on extrait par l'éther. La phase étherée est évaporée à sec sous pression réduite à température ordinaire et l'on reprend par 30 ml d'eau bouillante. La solution est filtrée à chaud sur du noir actif. Après refroidissement, le précipité est filtré et recristallisé trois fois dans l'eau bouillante légèrement acétique. Les cristaux obtenus possèdent les mêmes caractéristiques physiques et chimiques que le D (+) catéchine extraite du cœur de merisier. Le rendement d'extraction en catéchine est de l'ordre de 1,6 g % par rapport aux bourgeons secs.

2/ Variations saisonnières de la D (+) catéchine.

a) Méthode de dosage de la D (+) catéchine.

Le prélèvement végétal (un g) est broyé au mortier en présence de sable fin et de 20 ml d'alcool absolu. Le mélange est laissé 24 heures à température ordinaire puis filtré. L'alcoolat est concentré à sec puis extrait à l'éther de pétrole. Le résidu est repris par un ml d'alcool mesuré exactement. Une quantité connue de cette solution est déposée sous forme d'un trait de 5 cm sur un papier à chromatographie. Parallèlement à la solution à doser, on dépose deux taches d'une solution de concentration connue en D (+) catéchine. Le chromatogramme est développé dans le mélange acide acétique-eau (15 - 85) pendant 15 heures en chromatographie descendante. Après séchage du papier à température ordinaire, l'un des témoins de catéchine est révélé par le nitrate d'argent ammoniacal préparé extemporanément par addition d'ammoniaque concentrée à une solution de nitrate d'argent à 0,1 N jusqu'à disparition du trouble brun. La tache brun noir de catéchine permet de localiser l'échantillon à doser. La zone correspondante est éluée par l'alcool absolu à la température de 50° pendant 10 minutes. L'extract alcoolique est filtré sur laine de verre puis ajusté à 10 ml. L'absorption spectrophotométrique de cette solution est mesurée à 280 mμ. Le dosage s'effectue comparativement à une quantité connue de D (+) catéchine chromatographiée simultanément.

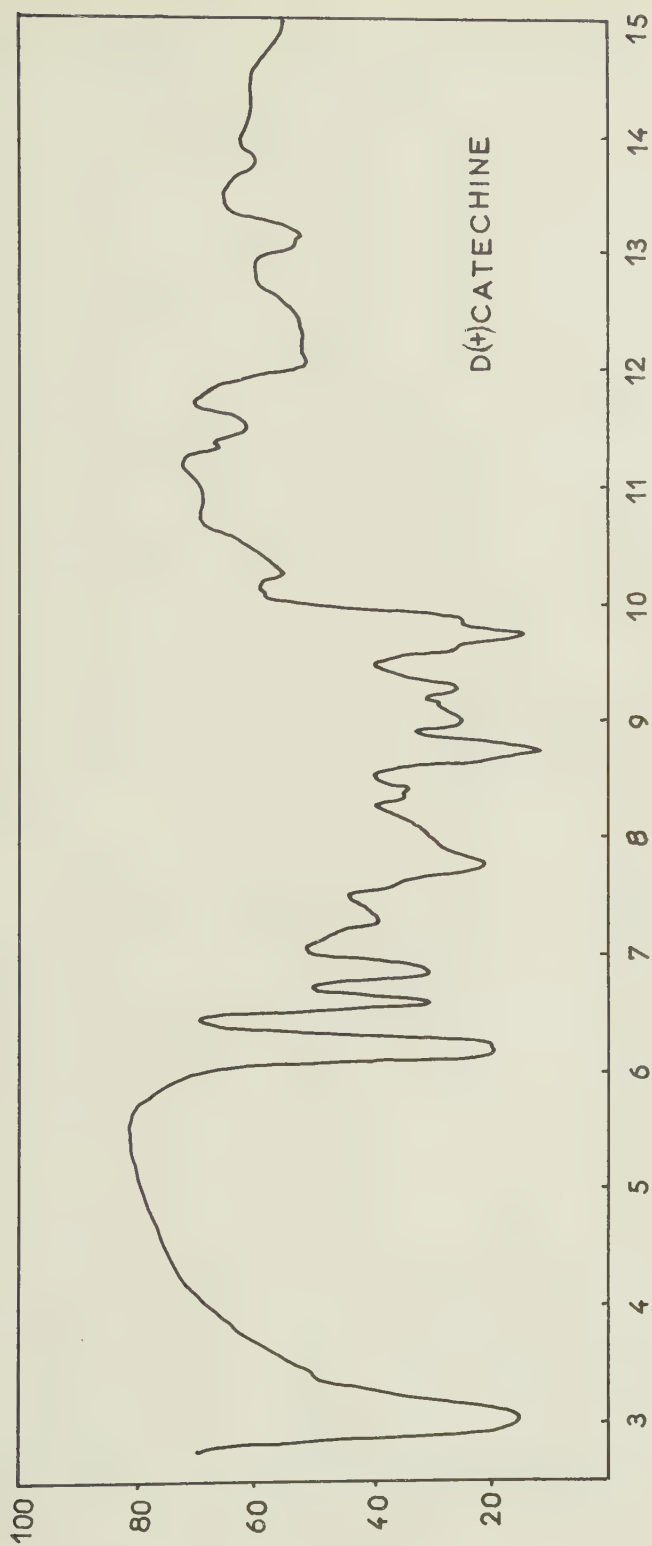


Figure 9 - Spectre infra-rouge de la D (+) catéchine. En abscisse : longueur d'onde en microns. En ordonnée : transmission en %. Examen effectué au spectrophotomètre Perkin-Elmer n° 12 sur un mg de D (+) catéchine pastillé avec 400 mg de bromure de potassium.

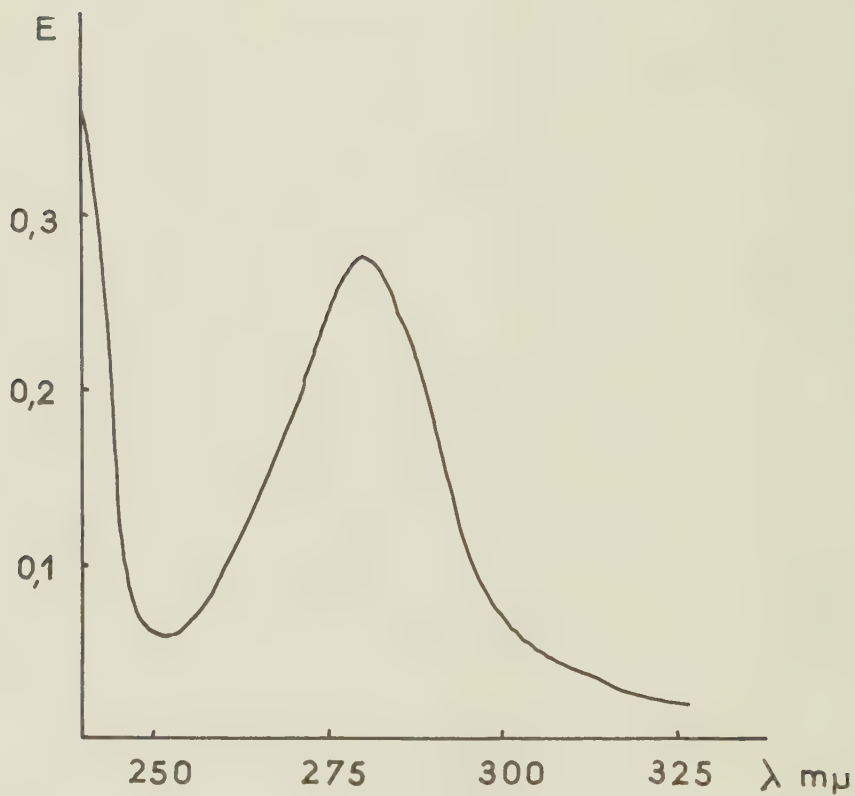


Figure 10 - Spectre ultra-violet de la D(+) catéchine dans l'alcool à 95° 2 mg dans 100 ml d'alcool.

b) Résultats.

Tous les bourgeons des différentes espèces de prunus examinées sont riches en D (+) catéchine. Dans les bourgeons du cerisier de Sainte-Lucie, la teneur en D (+) catéchine est voisine de 1% poids sec, tandis que dans le prunellier, elle est supérieure à 5% poids sec. A la fin de l'hiver, on observe un accroissement de la teneur de ce constituant. La quantité relativement importante en D (+) catéchine que l'on trouve dans les bourgeons résulte vraisemblablement d'un apport de réserves et d'une synthèse locale. Au printemps, la D (+) catéchine est de moins en moins abondante dans les feuilles, et elle devient assez faible dans les feuilles âgées. Les feuilles de prunellier sont les plus riches en D (+) catéchine alors que celles du cerisier de Sainte-Lucie n'en contiennent que très peu. La décroissance de la teneur en D (+) catéchine est générale pour toutes les espèces examinées. Quelques analyses sur la sève élaborée du merisier nous ont de plus montré que dans ce milieu la teneur de ce flavonoïde diminue beaucoup au cours de la végétation. La formation de la D (+) catéchine s'effectue dès les premières étapes de la végétation, et les feuilles adultes n'en synthétisent qu'une faible quantité. On peut donc prévoir que la période optimum pour l'administration d'un précurseur radioactif de cette molécule se situe au départ de la végétation, lorsque les feuilles se développent rapidement.

Tableau IX

Variations saisonnières de la D (+) catéchine dans
les bourgeons et dans les feuilles.
Résultats exprimés en % par rapport au poids sec.

Bourgeons						
	3-10	29-12	3-2	8-3		
Prunus armeniaca	1,4					
Prunus avium	4,3	4,2	4,5	4,9		
Prunus cerasus	3,8					
Prunus domestica	3,0	3,3	3,9	3,1		
Prunus mahaleb	0,96					
Prunus persica	2,8					
Prunus spinosa	5,3	5,5	6,0	6,2		

Feuilles						
	15-4	15-5	29-6	17-7	4-9	3-10
Prunus armeniaca		0,8			0,4	0
Prunus avium	2,1	1,5	1,2	1,1	0,79	0,50
Prunus cerasus		1,2			0,5	traces
Prunus domestica	1,7	1,2	0,6	0,49	0,46	0,2
Prunus mahaleb		0,3			0	0
Prunus persica		0,9			0,4	0,32
Prunus spinosa	4,3	2,6	1,8	1,3	1,0	0,7

II - LEUCOCYANIDINE

La découverte de la leucocyanidine est relativement récente. En 1920, Rosenheim [92] met en évidence dans la pellicule des raisins blancs, une substance qui par chauffage en milieu chlorhydrique, conduit à la cyanidine. Tayeau et Masquelier [111] en 1948 isolent pour la première fois la leucocyanidine à partir de la graine d'arachide. Bate Smith [4] montrera que cette substance est largement distribuée dans le règne végétal, surtout chez les plantes ligneuses.

La leucocyanidine existe dans les différentes parties de la plante puisqu'on la trouve dans les feuilles [55], dans l'écorce [55], dans les fleurs [90] et dans les fruits [50]. En collaboration avec Vallet, Nétien et Mentzer [29], nous avons également montré qu'elle se forme dans les cultures de tissus de vigne vierge.

Hillis et Swain [55 bis] ont tout récemment étudié l'évolution de la teneur en leucocyanidine des feuilles de *Prunus domestica*. Cette teneur augmente jusqu'à ce que les feuilles atteignent une taille maximum et décroît par la suite dans les feuilles âgées.

1/ Détermination analytique de la leucocyanidine dans les feuilles et les bourgeons de *Prunus*.

A partir d'un extrait aqueux de bourgeons de merisier, nous avons décelé par chromatographie sur papier une deuxième substance réductrice vis-à-vis du nitrate d'argent ammoniacal. L'extraction de cette substance a été conduite de la manière suivante : les bourgeons de merisier finement broyés sont extraits d'abord par l'éther humide qui élimine la D (+) catéchine. Après avoir chassé l'éther qui imprègne les bourgeons, ceux-ci sont traités par l'eau distillée à la température du laboratoire pendant 24 heures. La phase aqueuse est filtrée puis saturée par le chlorure de sodium et extraite par le butanol normal. La concentration de cette phase butanolique fournit un extrait brut qui est purifié selon la technique de Tayeau et Masquelier [111] et qui conduit à un produit pulvérulent mais non cristallin.

La microfusion alcaline de cette substance selon la méthode classique de Maurice et Mentzer [66] aboutit à la formation de phloroglucine et d'acide protocatéchique qui sont identifiés par chromatographie sur papier.

	Rf. (1)	Chlorure ferrique	P.nitraniline diazotée [14]
Phloroglucine	0,76		brune
Acide protocatéchique	0,85	vert	jaune

Les produits de la fusion alcaline permettent de penser que la substance extraite est de type flavonoïde.

Le spectre d'absorption ultra-violet de ce flavonoïde présente un minimum à 258 m μ et un maximum à 280 m μ . Ce spectre est très voisin de celui de la D (+) catéchine mais la position du minimum d'absorption est nettement différente (258 m μ au lieu de 250 m μ). Le flavonoïde donne une

(1) Solvant : Butanol-acide acétique-eau (4 - 1 - 5).

coloration grise avec le perchlorure de fer. Avec la paranitraniline diazotée, il donne une coloration brun jaune. Avec l'acide paratoluène sulfonique, il donne une coloration rouge [93], et avec le nitrate d'argent ammoniacal une coloration brun noir. Sur un chromatogramme, la réaction est néanmoins plus lente que dans le cas de la D (+) catéchine. Par chauffage en présence d'acide chlorhydrique, on obtient une coloration rouge. La chromatographie sur papier de ce colorant rouge montre que le R_f est identique à celui de la cyanidine. Sur le chromatogramme il apparaît toutefois deux constituants mineurs, de R_f 0,30 et 0,63 dans le solvant II.

	I	Rf.	II	E max.
Cyanidine	0,69		0,50	545 mμ
Colorant rouge	0,69		0,50	545 mμ

Solvant I : Butanol normal-acide chlorhydrique 2N (1 - 1)

Solvant II : Eau-acide acétique-acide chlorhydrique concentré (10 - 30 - 3).

La coloration des anthocyanes varie en fonction du pH. En milieu acide, ils sont rouges, en milieu neutre ils sont généralement violets et en milieu alcalin bleus. Ce changement de coloration en milieu neutre et en milieu alcalin est dû à une structure quinoïde qui produit un effet bathochrome [98]. Le colorant rouge que nous avons obtenu présente ces changements de teinte en fonction du pH.

Enfin, la méthode de colorimétrie différentielle de Bottomley basée

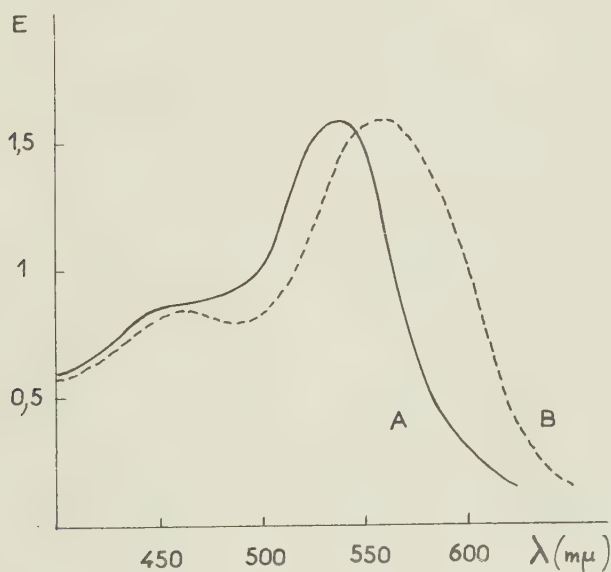
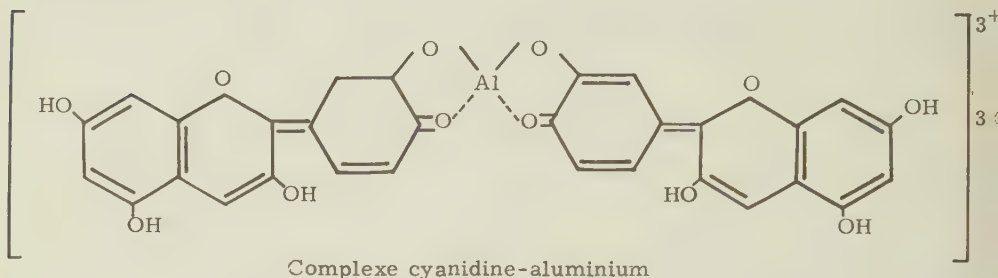


Figure 11 - Spectre d'absorption de la cyanidine. A : spectre en milieu éthanolique.
B : spectre en présence de chlorure d'aluminium.

sur la formation de chélate avec les sels d'aluminium est un test supplémentaire pour l'identification des anthocyanes possédant 2 groupements hydroxyles en ortho [13]. La formation de chélate modifie les propriétés spectrales des anthocyanes et provoque un effet bathochrome. Dans le cas de la cyanidine, le maximum d'absorption est déplacé de 545 mμ à 570 mμ (cf. figure 11).



La formation du complexe cyanidine-aluminium serait rendue possible par la présence d'un groupement carbonyle au voisinage d'un hydroxyle. Dans le cas de substances de type flavanique telles que la leucocyanidine et la D (+) catéchine, l'absence de forme résonante au voisinage d'un hydroxyle ne permet pas la formation de complexe avec le chlorure d'aluminium.

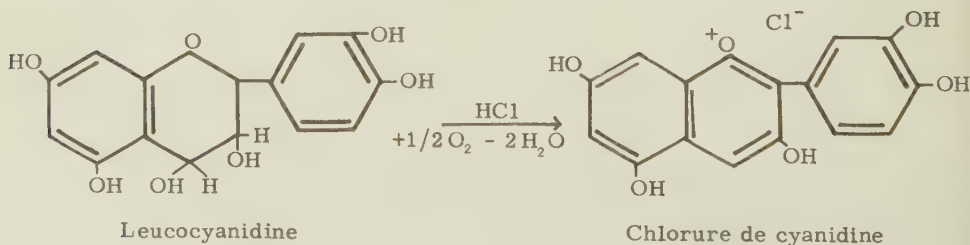
Le comportement chimique du flavonoïde extrait des bourgeons de merisier est identique à celui d'un échantillon de leucocyanidine extrait du pin maritime. Les Rf. chromatographiques et le spectre ultra-violet sont également identiques. Dans les bourgeons et les feuilles de l'abricotier, du prunier, du cerisier de Sainte-Lucie, du pêcher et du prunellier, nous avons mis en évidence la présence de ce même constituant, dont nous allons étudier les variations saisonnières.

2/ Variations saisonnières de la leucocyanidine.

a) Dosage de la leucocyanidine.

α) Rendement de la réaction d'oxydation de la leucocyanidine en cyanidine.

A partir d'un échantillon de leucocyanidine⁽¹⁾, nous avons effectué une oxydation en cyanidine par l'acide chlorhydrique 2 N à la température du bain-marie bouillant pendant 30 minutes.



(1) Nous remercions le Professeur Masquelier de nous avoir procuré un échantillon de leucocyanidine.

Le rendement obtenu par rapport à un échantillon de cyanidine est égal à 22%. Forsyth [39] signale un rendement voisin de notre résultat : 25%. Le faible rendement de la réaction s'explique par la formation de phlobaphènes qui sont des produits plus ou moins condensés. Le mauvais rendement de cette réaction provient également du fait que le milieu aqueux est défavorable à la production d'anthocyanes qui nécessite théoriquement une déshydratation. Roux [93] a opéré dans un milieu anhydre : acide chlorhydrique anhydre dans l'isopropanol en tube scellé, et dans ces conditions le rendement en anthocyanes s'élève à 42%, ce qui tend bien à confirmer le fait que la transformation en anthocyanes nécessite une déshydratation. Il est possible que la formation de phlobaphènes s'effectue selon un schéma analogue à celui qui conduit aux tanins catéchiques condensés, et qui implique l'ouverture de la chaîne hétérocyclique [41, 63].

β) Dosage de la leucocyanidine.

L'échantillon végétal, en général 2 g poids frais, est traité par 80 ml d'acide chlorhydrique 2 N au bain-marie bouillant pendant 40 minutes. La liqueur chlorhydrique est filtrée à chaud sur laine de verre, puis les feuilles sont à nouveau traitées par 50 ml d'acide chlorhydrique 2 N pendant 15 minutes au bain-marie bouillant. Les liqueurs chlorhydriques sont réunies, puis extraites 3 fois par l'éther ordinaire (cette liqueur étherée servira pour le dosage des flavonols). La cyanidine qui se trouve sous forme de chlorure de flavylum reste dans la phase aqueuse; elle est enfin extraite par 25 ml, puis 20 ml de butanol normal et on ajuste les extraits butanoli-ques à 50 ml ou 100 ml. L'absorption de cette solution est mesurée au spectrophotomètre Beckman à 545 mμ. Les résultats obtenus tiennent compte d'un rendement de conversion de leucocyanidine en cyanidine de 22%.

b) Résultats.

Tableau X

Evolution saisonnière de la leucocyanidine dans
les bourgeons et dans les feuilles.

Résultats exprimés en % poids sec.

	Bourgeons			
	3-10	21-12	3-2	8-3
Prunus avium	1,92	1,95	2,24	2,27
Prunus armeniaca	2,46	2,50	2,85	2,91
Prunus domestica	2,29	2,12	2,46	2,58
Prunus mahaleb	1,0	1,20	1,25	1,19
Prunus persica	1,3	1,39	1,31	1,10
Prunus spinosa		3,10	3,14	3,55

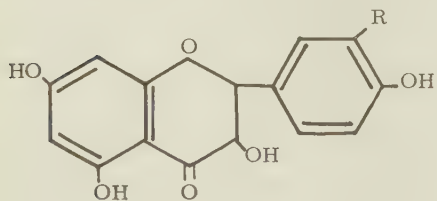
	Feuilles					
	15-4	15-5	29-6	17-7	4-9	3-10
Prunus avium	0,74	0,82	0,91	1,02	0,81	0,60
Prunus armeniaca	1,26	1,33	1,59	1,78	1,46	1,38
Prunus domestica	1,07	1,17	1,30	1,36	1,20	0,92
Prunus mahaleb	1,03	0,50	0,61	0,69	0,32	0,36
Prunus persica	0,30	0,33	0,48	0,40	0,38	0,32
Prunus spinosa	2,06	2,15	2,40	2,13	1,86	1,57

La leucocyanidine a été dosée aux différentes périodes de la végétation : bourgeons, jeunes feuilles, feuilles adultes et feuilles âgées. Les résultats consignés dans le tableau X nous montrent l'importance de la variation de ce constituant au cours du cycle végétatif. Les bourgeons sont très riches en leucocyanidine, et leur teneur varie de 1,1% poids sec pour le pêcher à 3,55% poids sec pour le prunellier. Dans les feuilles la teneur en leucocyanidine est plus faible puisque les maximums observés pour ces deux espèces sont respectivement de 0,48% poids sec et 2,40% poids sec. Dans les feuilles, la teneur en leucocyanidine augmente au cours de la fructification et décroît dans les vieilles feuilles. Cette décroissance est d'ailleurs plus ou moins rapide; dans les feuilles de pêcher et d'abricotier, par exemple, qui restent turgescentes jusqu'à la fin de l'été, le taux de leucocyanidine reste comparativement élevé. Le métabolisme saisonnier de la leucocyanidine dans les feuilles est assez différent de celui observé pour la D(+) catéchine puisqu'il n'y a pas de décroissance continue dans la teneur de ce constituant.

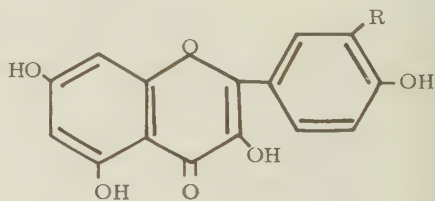
La période optimum pour l'étude de la biogénèse de la leucocyanidine à l'aide de précurseurs radioactifs se situe aux mois de mai et juin, au moment où la synthèse de cette molécule est la plus importante dans les feuilles.

III - FLAVANONOLS

Selon une hypothèse de Seshadri [103], les flavanonols représentent une étape importante dans la biogénèse des pigments benzopyraniques. Le fait que dans une même plante on trouve généralement des couples de substances dont les partenaires ne diffèrent que par la présence ou l'absence de 2 atomes d'hydrogène sur les carbones 2 et 3 (flavanonol - flavonol) laisse en effet prévoir une filiation entre ces différents constituants.



Flavanonol R = H Aromadendrine
 R = OH Taxifoline



Flavonol R = H Kaempférol
 R = OH Quercétine

A l'heure actuelle, on ne peut cependant que proposer des hypothèses fondées sur des réactions chimiques. Dans l'organisme végétal, et particulièrement dans les régions où le métabolisme est intense, les flavanols n'existent qu'en très faible quantité [77]. C'est principalement dans le cœur [22, 78] et dans l'aubier [76] que de telles substances s'accumulent et d'où il est possible de les extraire.

Néanmoins, l'absence de réaction spécifique des flavanols ainsi que la complexité des extraits de bois dans lesquels ces substances sont des constituants mineurs, rendaient difficile leur identification. Récemment, Pacheco a décrit une méthode de détection des flavanols grâce à un test coloré spécifique d'une grande sensibilité [75]. L'acétylation des flavano-

nols par l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium anhydre conduit à la formation de substances colorées en rouge. Ces substances dés-acétylées par l'acide chlorhydrique se transforment en dérivés rouges qui ont les caractéristiques des chlorures de flavylum. La séparation de ces colorants par chromatographie sur papier et la mesure de leur maximum d'absorption permet d'identifier les flavanonols de départ. Nous utiliserons cette méthode pour l'identification et le dosage des principaux flavanonols dans les bourgeons et dans les feuilles de l'abricotier, du merisier, du griottier, du prunier et du pêcher.

1/ Détermination analytique.

L'échantillon végétal (5 g) est broyé au mortier avec du sable fin et épuisé par l'alcool éthylique. Après filtration, l'extrait alcoolique est concentré à sec, puis extrait à l'éther de pétrole. Le résidu est alors traité par 50 ml d'acide chlorhydrique à 5% à l'ébullition pendant 20 minutes. Ce traitement a pour but d'éliminer les leucodérivés qui accompagnent fréquemment les flavanonols. La phase aqueuse est extraite 3 fois par l'éther puis le solvant est évaporé et le résidu sec est chauffé à reflux pendant 2 heures dans 10 ml d'anhydride acétique bouillant additionné de 100 mg d'acétate de sodium fondu. Le produit est désacétylé par chauffage avec 40 ml d'acide chlorhydrique 6 N pendant 10 minutes. On évapore ensuite à sec et l'on reprend par l'acide chlorhydrique dilué. Cette phase aqueuse est lavée à l'éther et l'on extrait enfin le colorant rouge par le butanol normal. Une séparation chromatographique convenable est réalisée dans le mélange acide acétique-eau-acide chlorhydrique concentré (30 - 10 - 3). Le Rf. du dérivé coloré de la taxifoline (tétrahydroxy 5 - 7, 3' - 4' flavanone 3 ol) est 0,50 tandis que celui du dérivé coloré de l'aromadendrine (trihydroxy 5 - 7, 4' flavanone 3 ol) est 0,69. Les maximums d'absorption sont situés respectivement à 545 et 535 mμ.

L'élution des taches du chromatogramme par l'alcool éthylique et la spectrophotométrie de cet éluat au maximum d'absorption permet d'en effectuer un dosage.

Cette méthode analytique nous a permis d'identifier la taxifoline et l'aromadendrine dans l'abricotier, le merisier, le griottier, le prunier et le pêcher.

La détermination des flavanonols peut néanmoins s'effectuer directement lorsque la concentration est suffisante. La taxifoline en particulier, a pu être décelée par chromatographie sur papier à partir de l'extrait étheré précédent. Les Rf. obtenus sont figurés dans le tableau XII. La fluorescence de la taxifoline est brune; elle réagit avec le nitrate d'argent ammoniacal pour donner une coloration vert olive différente de celle observée avec la D (+) catéchine ou la leucocyanidine.

Le spectre ultra-violet de la taxifoline présente un minimum à 250 mμ, un maximum à 290 mμ et un épaulement à 335 mμ (cf. figure 12).

2/ Métabolisme de la taxifoline et de l'aromadendrine.

a) Evolution saisonnière.

La détection des flavanonols a été réalisée d'après la méthode décrite par Pacheco [75]. Nous avons dosé la taxifoline et l'aromadendrine à différentes époques de l'année dans les feuilles et les bourgeons de l'abricotier, du merisier, du griottier, du prunier et du pêcher. Les flavanonols sont

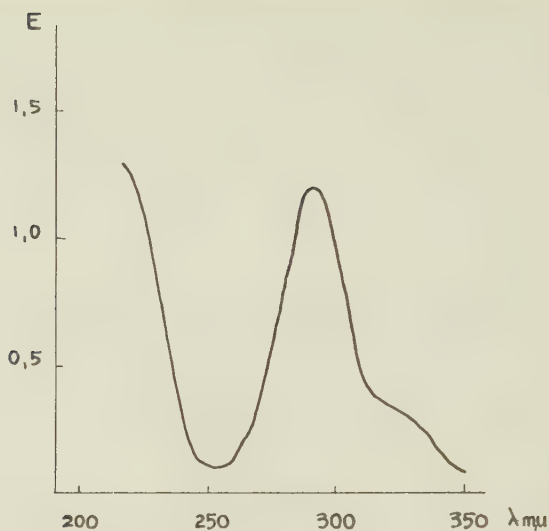


Figure 12 - Spectre d'absorption ultra-violet de la taxifoline dans l'alcool éthylique.
Concentration : 2 mg dans 100 ml.

localisés essentiellement dans les bourgeons. Dans les jeunes feuilles, on décèle encore l'aromadendrine et la taxifoline dans le pêcher et le merisier. Les feuilles adultes en sont totalement dépourvues, ce qui tend à montrer une consommation enzymatique rapide de ces constituants. La taxifoline est généralement plus abondante que l'aromadendrine dans les feuilles et les bourgeons, sauf dans le cas du pêcher où ce dernier flavanonol prédomine. La période qui paraît la plus favorable à l'étude de la biosynthèse des flavanonols est celle qui précède l'ouverture des bourgeons. Dans les jeunes feuilles, la méthode des traceurs permettrait de vérifier si les flavanonols se transforment en flavonols selon l'hypothèse de Seshadri [103].

Tableau XI

Variations saisonnières des flavanonols.
Résultats exprimés en mg/g de poids sec.

		Bourgeons			Feuilles		
		3-10	29-12	28-2	15-4	15-5	29-6
P. armeniaca	Taxifoline	0,10	0,10	0,18	0		
	Aromadendrine	traces	traces	traces	0		
P. avium	Taxifoline	0,18	0,19	0,26	0,11	0,07	0,03
	Aromadendrine	0,04		0,12	0		
P. cerasus	Taxifoline	traces	0,10	0,14	0		
	Aromadendrine	traces	traces	0,08	0		

Tableau XI

(Suite)

		Bourgeons			Feuilles		
		3-10	29-12	28-2	15-4	15-5	29-6
P. domestica	Taxifoline		0,10	0,13	traces		
	Aromadendrine		0,06	0,09	0	0	
P. persica	Taxifoline	0,15	0,23	0,3	0,1	0	
	Aromadendrine	0,50	0,50	0,80	0,3	traces	0

Quelles transformations les flavanonols peuvent-ils subir dans les feuilles ? La déshydrogénation des flavanonols en flavonols se réalise au laboratoire par chauffage à l'air en milieu acide [83], mais cette oxydation correspond-elle "in vivo" au métabolisme normal. C'est la raison pour laquelle nous avons tenté quelques essais de métabolisme de la taxifoline sur des broyats de feuilles et de bourgeons.

b) Essais de métabolisme de la taxifoline.

Expérience I.

Un gramme de bourgeons de merisier sont broyés en présence de 3 ml de tampon phosphate de pH 7,0 et de 2 ml d'une solution de cyanure de potassium à 0,1 mg par ml. On ajoute 8 mg de taxifoline et on laisse le mélange 24 heures à 30°. Un essai témoin est réalisé dans les mêmes conditions avec des bourgeons préalablement étuvés à 110°. Dans l'essai témoin, la quantité de taxifoline retrouvée est de 30%. L'analyse du milieu ne montre aucun accroissement de la teneur en flavonols ni en leucodérivés correspondants. Une deuxième expérience a été effectuée avec des feuilles adultes de merisier.

Expérience II.

Dans cette expérience, on opère sur 1 g de mésophylle de feuilles de merisier broyées au lieu de 1 g de bourgeons. Les conditions opératoires sont identiques aux précédentes. Après 24 heures de séjour à 30°, la quantité de taxifoline qui a disparu est égale à 55%. Il ne nous a cependant pas été possible d'observer un accroissement dans la teneur en quercétine ou en leucocyanidine, ni en tout autre produit de nature flavonique. La destruction partielle de la taxifoline est probablement due à une polymérisation du type observé pour les catéchines [41] ou les leucodérivés. La transformation oxydative de la taxifoline en quercétine ne semble pas possible à l'état d'aglycone dans ces conditions.

IV - FLAVONOLS

Les flavonols sont des pigments végétaux qui colorent fréquemment les organes floraux et les fruits; ils se trouvent aussi bien dans les plantes herbacées que dans les plantes ligneuses [5]. Du point de vue biochimique, on pense qu'ils joueraient un rôle analogue à celui de l'acide chlorogénique dans la protection contre les microorganismes et les insectes [102].

Les flavonols apparaissent non seulement dans les fleurs, mais aussi

dans les feuilles qui en effectuent la synthèse. Le plus souvent, ces pigments ne s'accumulent pas dans les feuilles car ils existent sous une forme hétérosidique hydrosoluble que la sève élaborée peut facilement transporter dans différentes régions de la plante.

Au cours de précédentes recherches biochimiques sur les feuilles de merisier, la quercétine (tétrahydroxy 5, 7, 3', 4' flavonol) a été mise en évidence [61]. Cependant, ce flavonol existe normalement dans les feuilles sous une forme conjuguée que nous nous sommes proposés de déterminer.

1/ Isolement du rutoside à partir des feuilles de merisier, et présence de cet hétéroside flavonique dans les feuilles d'abricotier, de prunier, et de prunellier [30].

Dans le but de définir la nature de l'hétéroside de la quercétine contenu dans les feuilles de merisier, nous avons opéré de la manière suivante : 1 kg de feuilles fraîches de merisier ramassées dans le courant du mois de juin sont finement broyées, puis extraites par macération à froid dans l'alcool à 95° pendant 48 heures. Une deuxième extraction est effectuée dans les mêmes conditions. Les extraits alcooliques sont réunis et concentrés jusqu'à un volume de 0,5 l environ. La chlorophylle est éliminée par épuisement à l'éther de pétrole, puis les aglycones sont extraits par l'éther ordinaire. La liqueur brune est ensuite purifiée par précipitation fractionnée à l'aide de l'acétate de plomb. Une première précipitation par 30 ml d'une solution saturée d'acétate de plomb élimine les impuretés acides, en particulier l'acide chlorogénique. Les hétérosides flavoniques sont ensuite précipités par addition de 50 ml de la solution d'acétate de plomb, le pH étant amené à 7 par l'ammoniaque normale. Le précipité de sel de plomb est recueilli par filtration puis décomposé par addition d'acide sulfurique normal jusqu'à pH 3. La solution est alors saturée par le chlorure de sodium, et extraite deux fois par l'acétate d'éthyle. Les extraits d'acétate d'éthyle sont réunis et concentrés à sec, puis repris par quelques millilitres d'alcool éthylique. La solution est alors déposée sur plusieurs feuilles de papier à chromatographie Whatman n°1, sous forme d'un trait en vue d'une séparation. Les chromatogrammes sont développés dans le mélange acide acétique-eau (15 - 85). Après séchage à l'air, l'observation en lumière ultra-violette permet de localiser une bande fluorescente en brun jaunâtre de Rf 0,50. Cette bande est découpée puis éluée au moyen d'alcool à 80°. L'extrait alcoolique concentré sous vide à 40° donne un résidu de couleur jaune qui est recristallisé dans l'acide acétique à 20%. La température de fusion du produit est de 190° (bloc Maquenne).

L'analyse élémentaire de l'hétéroside desséché 24 heures sous vide de 0,1 mm à 100° donne C. % 49, 79, H. % 5, 55; calculé pour $C_{27}H_{34}O_{18}$ C. % 49, 50, H. % 5, 23.

Le spectre ultra-violet de l'hétéroside en solution éthanolique présente des maximums à 260 et 360 mμ, un palier à 300 mμ et des minimums à 245 et 285 mμ. Le spectre dans la soude centinormale présente des maximums à 275, 325 et 410 mμ et des minimums à 250, 295 et 350 mμ.

L'hétéroside est insoluble dans l'éther, faiblement soluble dans l'acétate d'éthyle, soluble dans l'eau chaude, l'alcool méthylique et éthylique. Il réagit avec le magnésium et l'acide chlorhydrique en donnant une coloration rouge, et avec le perchlorure de fer en donnant une coloration verte.

L'hydrolyse dans l'acide chlorhydrique à 5% pendant 2 heures à l'ébullition libère la quercétine et une quantité équimoléculaire de glucose et de rhamnose, ces deux sucres étant identifiés par chromatographie sur papier dans le solvant butanol-acide acétique-eau (70 - 18 - 12) et révélation au phosphate d'aniline [26].

Le spectre d'absorption ultra-violet de la quercétine dans l'éthanol présente des maximums à 258 et 375 m μ , un palier à 310 m μ , et des minimums à 240 et 290 m μ . Dans la soude centinormale, le spectre est caractéristique. Il présente un maximum important à 320 m μ , un minimum à 275 m μ et un point d'inflexion à 370 m μ (cf. figure 13).

Toutes ces propriétés sont celles du rutoside. Le point de fusion n'est pas abaissé par mélange avec un échantillon de rutoside. L'analyse élémentaire correspond à la formule $C_{27}H_{30}O_{16}$, $2H_2O$.

En chromatographie descendante à 20° environ, les R_f de l'hétéroside isolé et du rutoside sont identiques : 0,75 dans l'acide acétique-eau (60 - 40), 0,64 dans le mélange butanol-acide acétique-eau (4 - 1 - 5), 0,50 dans l'acide acétique-eau (15 - 85), 0,56 dans l'alcool isopropylique-eau (22 - 78), 0,21 dans l'acide acétique-eau (2 - 98).

2/ Identification du Kaempferol dans les feuilles de quelques Prunus [31].

Dans les feuilles de merisier, l'existence d'un deuxième flavonol a déjà été signalée [61]. Ce flavonol existe dans les feuilles sous forme hétérosidique. Dans le présent travail, nous envisageons de déterminer la nature de l'aglycone de ce deuxième flavonol.

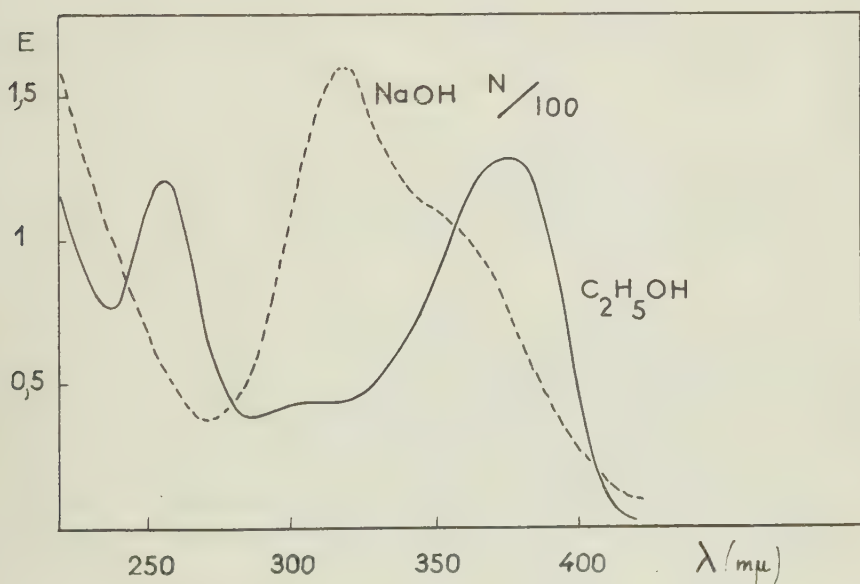


Figure 13 - Spectre d'absorption ultra-violet de la quercétine.

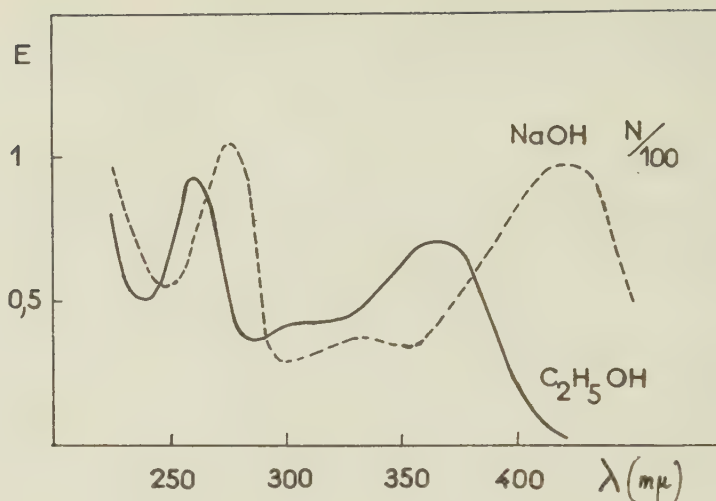


Figure 14 - Spectre d'absorption ultra-violet du rutoside.

Afin d'isoler et d'identifier ce flavonol, nous avons procédé de la manière suivante : les feuilles vertes de merisier sont traitées par l'acide chlorhydrique normal pendant 40 minutes au bain-marie bouillant. La solution qui a une teinte rougeâtre due à l'oxydation des leucodérivés en anthocyanes, est filtrée à chaud. Après refroidissement, la solution aqueuse est épuisée par l'éther ordinaire. Les phases éthérées sont réunies puis concentrées à sec sous pression réduite à 20°. Le résidu est déposé sous forme d'un trait sur plusieurs feuilles de papier à chromatographie Whatman n°1. Les chromatogrammes sont développés en chromatographie descendante à l'aide du mélange acide acétique-eau (60 - 40) pendant 24 h. Après séchage à l'air, l'observation en lumière ultraviolette permet de localiser deux bandes fortement fluorescentes en jaune : la première bande de Rf. 0,30 correspond à la quercétine et une deuxième bande de Rf. 0,44. Cette deuxième bande est éluée par l'alcool à 80°, puis l'on concentre à sec sous vide à 30°. Le résidu est recristallisé 3 fois dans l'eau acétique. La température de fusion du flavonol isolé est de 280° (bloc Maquenne). L'analyse élémentaire du flavonol desséché 24 heures sous vide à 80° donne C.p. 100 62, 47; H.p. 100 3, 28; calculé p. 100 pour $C_{15}H_{10}O_6$; C 62, 93; H 3, 49.

Le flavonol se présente sous forme d'aiguilles jaunes solubles dans l'alcool éthylique et méthylique, dans l'éther, la pyridine, légèrement solubles dans l'eau chaude. Le dérivé acétylé de ce flavonol fond à 179° (bloc Maquenne). Il réagit avec le magnésium et l'acide chlorhydrique pour donner une coloration rouge, et avec le perchlorure de fer en donnant une coloration verte. Avec la paranitraniline diazotée, il donne une coloration jaune or [14]. Il réagit lentement avec le nitrate d'argent ammoniacal; sur un chromatogramme une coloration brune apparaît après 10 minutes seulement, tandis que la catéchine réagit instantanément et que le leucocyanidol réagit après 2 à 3 minutes. La fusion alcaline en présence de potasse caustique selon la méthode de Maurice et Mentzer [66] pendant 3 minutes à 230° libère la phloroglucine et avec un rendement plus faible, l'acide parahydrobenzoïque.

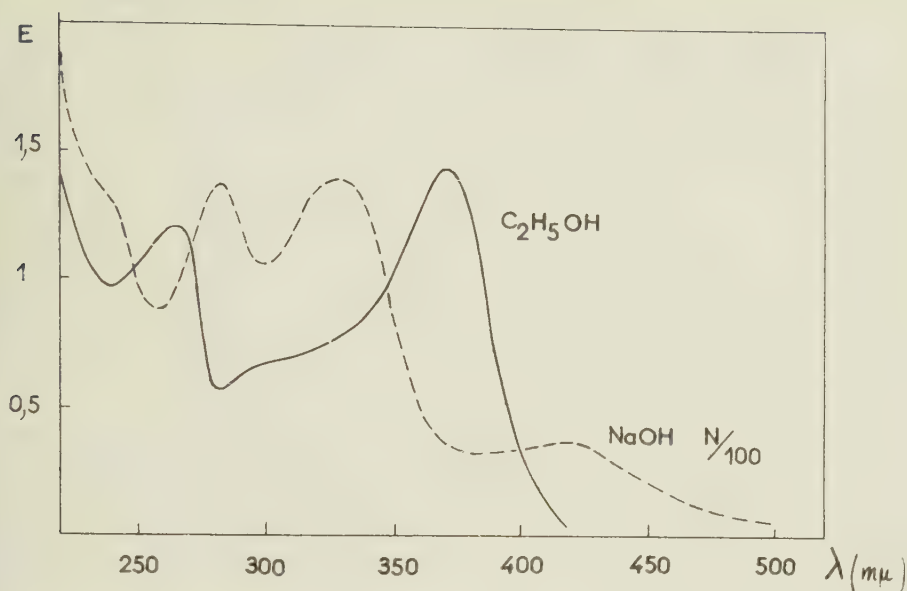


Figure 15 - Spectre ultra-violet du flavonol isolé des feuilles de merisier.

Le spectre ultra-violet du flavonol dans l'alcool éthylique présente des maximums à 267 et 367 $m\mu$ et des minimums à 238 et 282 $m\mu$. Dans la soude centinormale, le spectre présente 3 maximums à 285, 320 et 425 $m\mu$ et des minimums à 257, 305 et 370 $m\mu$.

Toutes ces propriétés sont celles du kaempférol. Le point de fusion n'est pas abaissé par mélange avec un échantillon de kaempferol⁽¹⁾. Les Rf. chromatographiques dans plusieurs systèmes de solvants sont également identiques à ceux d'un échantillon de kaempférol chromatographié simultanément (cf. tableau XII).

A partir d'hydrolysats de feuilles de *P. armeniaca*, *P. cerasus*, *P. mahaleb*, *P. persica*, *P. spinosa* et *P. domestica* obtenus dans les conditions précédemment décrites pour *P. avium*, nous avons identifié par chromatographie sur papier et spectre ultra-violet en milieu neutre et alcalin, un flavonol identique au kaempférol extrait du merisier.

Cette méthode d'hydrolyse nous a également permis de montrer que les feuilles de ces mêmes prunus contenaient toutes de la quercétine dans des proportions plus ou moins grandes.

(1) Nous remercions le Professeur Paris de nous avoir fait parvenir un échantillon de kaempférol.

3/ Variations saisonnières de la quercétine et du kaempférol.

a) Méthode de dosage.

Le kaempférol et la quercétine présents dans les feuilles de ces quelques prunus ont été dosés à l'état d'aglycones après hydrolyse chlorhydrique par spectrophotométrie. Pour cela, 2 g poids frais de feuilles sont traitées par 80 ml d'acide chlorhydrique 2 N au bain-marie bouillant pendant 40 minutes. La liqueur chlorhydrique est filtrée à chaud sur laine de verre, puis les feuilles sont à nouveau traitées par 50 ml d'acide chlorhydrique 2 N pendant 15 minutes au bain-marie bouillant. Les liqueurs chlorhydriques sont réunies et extraites 3 fois par l'éther ordinaire. Les phases étherées sont rassemblées puis lavées à l'eau distillée et concentrées à sec sous pression réduite. Le résidu est repris par un ml d'alcool absolu et l'on dépose 0,1 ou 0,2 ml de cette solution sous la forme d'un trait de 10 cm environ sur une feuille de papier à chromatographie Whatman n°1. Le chromatogramme est développé dans le mélange acide acétique-eau (60 - 40) en chromatographie descendante pendant 24 h. Les bandes fluorescentes jaunes de Rf. 0,30 et 0,44 correspondant à la quercétine et au kaempférol sont découpées puis éluées par l'alcool à 80° pendant 15 minutes à 50°. Les éluats alcooliques sont filtrés sur laine de verre et enfin ajustés à 25 ml. L'absorption lumineuse de la quercétine est mesurée à 375 mμ et celle du kaempférol à 367 mμ. Le dosage s'effectue comparativement à des quantités connues de quercétine et de kaempférol.

Tableau XII

Valeurs des Rf. en chromatographie ascendante à 18° sur papier Arches 302

	1	2	3	4	5	6	7
Catéchine	0,42	0,52	0,63	0,70	0,52	0,65	0,43
Leucocyanidine	0-0,38	0-0,47	0-0,30	0-0,15	0-0,55	0-0,15	0
Taxifoline	0,30	0,53	0,72	0,83	0,45	0,83	0,64
Quercétine	0,0	0,02	0,30	0,42	0,02	0,72	0,38
Kaempférol	0,0	0,03	0,44	0,57	0,02	0,87	0,71

Solvant 1 : Ac. acétique-eau (2 - 98)

Solvant 2 : Ac. acétique-eau (15 - 85)

Solvant 3 : Ac. acétique-eau (60 - 40)

Solvant 4 : Ac. acétique-ac. chlorhydrique-eau (30 - 3 - 10)

Solvant 5 : Phase aqueuse de butanol-ac. acétique-eau (4 - 1 - 5)

Solvant 6 : Phase solvant du butanol-ac. acétique-eau (4 - 1 - 5)

Solvant 7 : Phénol-eau (80 - 20).

La chromatographie de la leucocyanidine provoque des traînées probablement dues à des associations moléculaires [109].

Tableau XIII

Caractérisation des dérivés benzopyraniques

Chlorure ferrique en solution alcoolique 1 %

Permanganate de potassium en solution aqueuse à 0, 5%

Nitrate d'argent décinormal additionné d'ammoniaque 2 N jusqu'à décoloration
Paranitraniline diazotée [14].

	FLUORESCENCE U.V.	CHLORURE FERRIQUE	PARANITRANILINE DIAZOTÉE	PERMANGANATE DE POTASSIUM	NITRATE D'Ag. AMMONIACAL
Catéchine	brune	vert	brun jaune	décoloration	brun noir
Leucocyanidine		brun	brun jaune	décoloration	brun après 3'
Taxifoline	brune	brun violet	jaune pâle	décoloration	vert olive
Quercétine	jaune	vert	jaune or		brun après 10'
Kaempférol	jaune	vert	jaune or		brun après 10'

b) Résultats.

La teneur en flavonols dans les bourgeons et dans les feuilles varie considérablement en fonction du cycle saisonnier. Très faible dans les bourgeons, elle atteint un maximum pendant la période de fructification pour décroître nettement pendant la période de jaunissement des feuilles (cf. tableau XIV).

Tableau XIV

Variation saisonnière de la quercétine et du kaempférol

dans les bourgeons et dans les feuilles

Résultats exprimés en mg/g de poids sec

		3-10	28-2	15-5	30-7	7-9	3 10
P. armeniaca	Quercétine	0,15	0,63		1,36		
	Kaempférol	0	0		0,13		
P. avium	Quercétine	0,12	0,28	0,97	1,25	0,52	0,34
	Kaempférol	0,30	0,43	0,71	1,26	0,73	0,48
P. cerasus	Quercétine	0,15		0,88	1,30	0,9	0,55
	Kaempférol	0,32		0,96	1,03	0,8	0,48
P. domestica	Quercétine	0,18	0,20	0,30	0,36	0,4	
	Kaempférol	0,10	0,13	0,15	0,19	0,2	
P. mahaleb	Quercétine	0,13		1,0	1,5	0,7	0,5
	Kaempférol	0		0,44	0,74	0,3	0,22
P. persica	Quercétine	0,24	0,37	0,82	1,0	1,4	0,9
	Kaempférol	0,15	0,29	0,98	1,2	1,2	0,95
P. spinosa	Quercétine			1,05	1,4	2,4	1,8
	Kaempférol			1,37	1,98	1,8	1,2

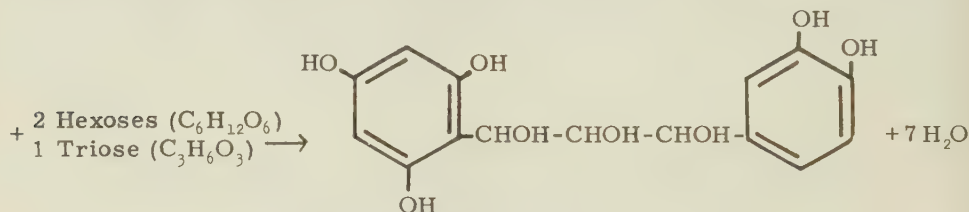
Dans la sève élaborée de merisier les plus fortes teneurs en glucosides de flavonols ont été observées au mois d'août, tandis que les teneurs les

plus faibles se situent au mois de mars⁽¹⁾. La formation d'hétérosides de flavonols s'effectue principalement dans les feuilles, les bourgeons semblent ne pas avoir la possibilité de réaliser une telle synthèse puisque seuls les aglycones sont décelés. Chez le sarrasin, Underhill a observé une augmentation de la teneur en rutoside (Rhamnoglucoside 3 de la quercétine) avec l'âge des feuilles jusqu'à la période de floraison, puis une diminution par la suite [107]. En ce qui concerne les prunus que nous avons examinés, l'accroissement de la teneur en flavonols des feuilles se prolonge au-delà de la floraison, puisque la quantité maximum de ces pigments est généralement observée au mois de juillet. La période la plus favorable pour étudier la biogénèse de ces pigments à l'aide de précurseurs radioactifs, se situe approximativement aux mois de juin ou juillet.

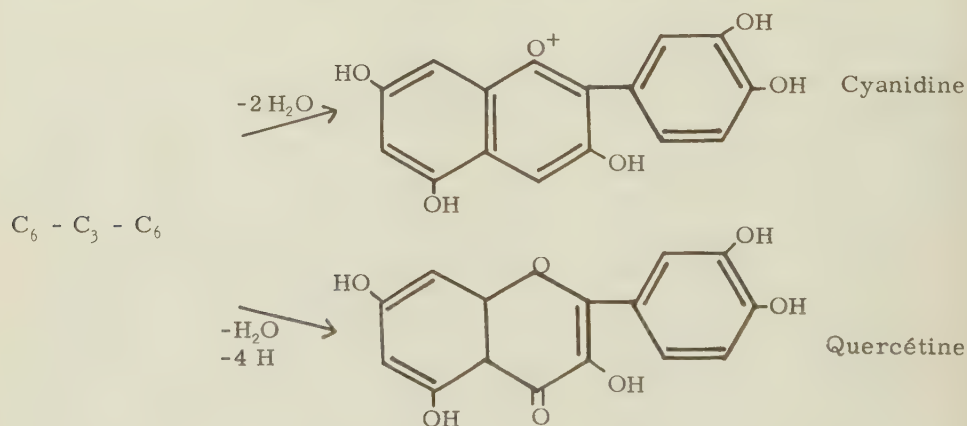
V-BIOSYNTHESES ET INTERRELATIONS DES PIGMENTS FLAVONIQUES

1/ Biosynthèse des flavonoïdes.

En 1936, Robinson [91] a émis la première hypothèse concernant la biosynthèse des pigments flavonoïdes. Selon Robinson, deux molécules d'un hexose se combinent avec un triose pour former un composé intermédiaire $C_6-C_3-C_6$; la chaîne en C_3 de ce composé



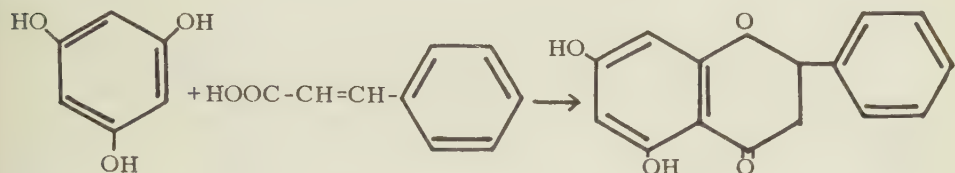
peut ensuite se déshydrater ou s'oxyder pour donner naissance à des flavonoïdes de types différents, par exemple un anthocyane ou un flavonol.



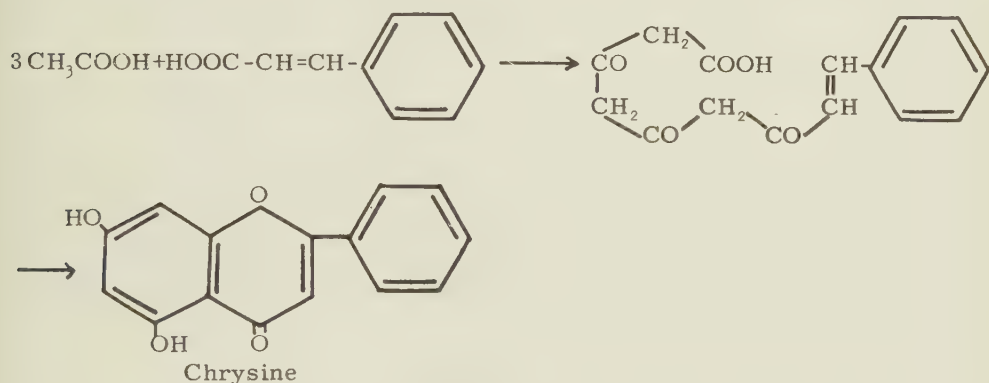
Une autre voie biogénétique était également proposée par cet auteur au sujet de la formation du noyau A dont l'origine pourrait être la phloroglucine.

(1) Il existe ainsi un parallélisme entre la variation de la teneur en glucosides de flavonols dans les feuilles et dans la sève élaborée.

Plus récemment, Mentzer [67], en 1952 suggère que la phloroglucine puisse se condenser avec l'acide cinnamique "in vivo" par analogie avec la formation de dihydrochrysine réalisée au laboratoire à partir de ces deux composés.



Birch et Donovan [11] en 1953 émettent l'hypothèse de la formation du noyau A des flavonoïdes à partir de 3 molécules d'acide acétique.

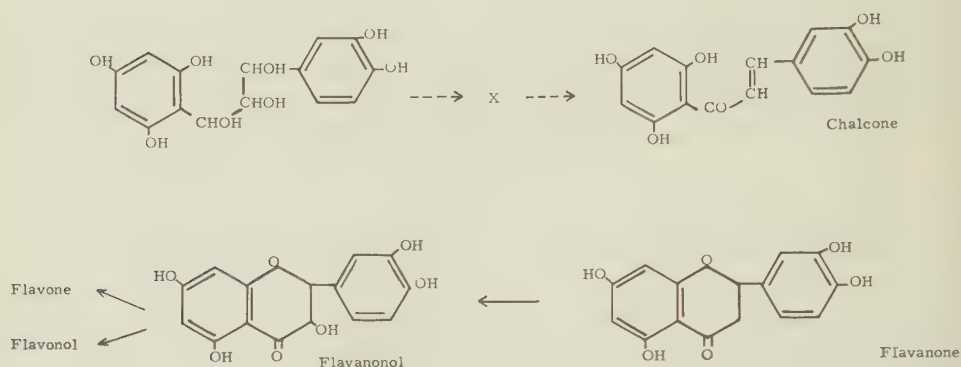


La confirmation expérimentale de cette dernière hypothèse vient d'être apportée par les travaux de Underhill, Watkin et Neish [114], Comte, Ville, Zwingelstein et Mentzer [25], et Grisebach [47]. L'administration d'un précurseur radioactif du type phénylpropane tel que l'acide cinnamique au sarrazin [114] ou bien au merisier [25] aboutit à la formation de flavonoïdes marqués. L'incorporation d'acétate radioactif au chou rouge conduit également à la formation de cyanidine marquée sur le noyau A [47]. Grâce à ces travaux, il est actuellement clair que le noyau A dérive de l'acide acétique et que le reste de la molécule provient d'un précurseur du type phénylpropane. Cependant, les intermédiaires entre ces précurseurs et la structure flavonoïde sont totalement inconnus de même que les interrelations "in vivo" entre ces différents pigments.

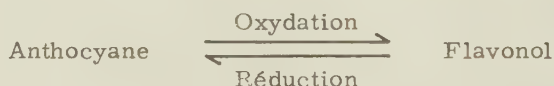
Seshadri se basant sur l'identité du mode de substitution des divers types de flavonoïdes dans un grand nombre d'espèces végétales a émis l'hypothèse d'une filiation de ces pigments à partir des chalcones [103].

Ainsi, dans une espèce donnée on rencontre fréquemment une chalcone et la flavanone correspondante ou bien encore un flavanone et le flavonol correspondant. L'interconversion des flavanones et des chalcones est bien connue et se réalise facilement [89]. De même, les flavanones se transforment en hydroxy 3 flavanones par hydroxylation. D'après Seshadri, une déshydratation ultérieure conduirait aux flavones et la déshydrogénation

aux flavonols. Les flavanonols occuperaient alors une position intermédiaire importante dans la filiation des flavonoïdes.



Pour plusieurs auteurs, il y aurait également une relation entre les flavonols et les anthocyanes. Le fait que les flavones et les anthocyanes coexistent fréquemment dans une plante et que la réduction *in vitro* des flavonols en anthocyanes est une opération facilement réalisable, a permis à Sando [96] et à Blank [12] de suggérer une réaction d'oxydo-réduction "in vivo" entre ces constituants.



Chez le sarrazin, Grisebach vient cependant de démontrer que cette transformation ne s'effectue pas.

Les renseignements sur ces interconversions des flavonoïdes sont très limités à l'heure actuelle. Dans les feuilles de *Poncirus trifoliata* Hattori [53] a isolé un glucoside de flavanone, la poncirine et un glucoside de flavone correspondant, la rhoifoline. L'étude de l'évolution saisonnière de la teneur de ces deux constituants a montré que les jeunes feuilles contenaient de la poncirine et peu de rhoifoline, tandis que les feuilles âgées ne renferment pratiquement que la rhoifoline. Hattori pense à une transformation de la flavanone en flavone correspondante dans les feuilles.

Comte [25], dans une recherche sur la biogénèse des dérivés flavonoïdes du merisier à partir de l'acide cinnamique radioactif a mis en évidence qu'après 8 jours d'incorporation de cet acide à de jeunes plants, les flavonoïdes combinés (glucosides) étaient très radioactifs (68% de la radioactivité totale des flavonoïdes). Après une autre expérience d'incorporation d'une durée de 30 jours, la radioactivité des flavonoïdes combinés par rapport à la radioactivité totale de ces composés s'abaissait de 68% à 40%. Cette diminution de la radioactivité est compensée par un accroissement

du marquage des flavonoïdes libres et des leucodérivés. De telles expériences permettent de déduire que des glucosides flavoniques se forment en premier lieu, et que par la suite leur métabolisme se traduit par une augmentation des flavonoïdes libres et des leucodérivés.

La radioactivité de la D (+) catéchine au cours de ces mêmes expériences demeure sensiblement constante. Ce fait semble indiquer un catabolisme assez lent de ce composé dans le merisier, et ne permet pas d'envisager l'hypothèse d'une transformation en d'autres dérivés flavonoïdes.

Dans l'étude de l'évolution saisonnière des flavonoïdes des feuilles de prunus, nous avons montré que les flavanonols se trouvaient uniquement dans les jeunes feuilles et que leur disparition coïncidait avec une synthèse accrue de flavonols : cette observation évoque une transformation possible entre ces deux types de dérivés selon le schéma proposé par Seshadri. La période optimum qui permettrait par incorporation d'un flavanonol radioactif, de vérifier cette hypothèse de transformation en flavonols, se situe au début de la végétation alors que les feuilles sont petites.

En ce qui concerne la catéchine, nous avons observé une teneur relativement faible de ce constituant dans les feuilles au cours de l'été. Par contre, la teneur de cette molécule dans les bourgeons et les jeunes feuilles est plus importante. L'étude de la biogénèse de la catéchine et de ses interrelations éventuelles avec les autres dérivés flavoniques pourrait être envisagée dans les tous premiers stades de la végétation.

Le métabolisme des flavonols apparaît très intense lorsque les feuilles atteignent une taille adulte, c'est-à-dire aux mois de juin ou juillet. Cette période semble très favorable à l'étude de leur biogénèse et de leur transformation possible en leucodérivé.

La présence de l'acide p. hydroxyphénylpyruvique dans les jeunes feuilles suggère que cette molécule est peut-être un précurseur dans la biosynthèse des flavonoïdes au même titre que l'acide phénylpyruvique puisqu'une molécule telle que l'acide p. hydroxycinnamique s'intègre aussi bien que l'acide cinnamique dans le squelette de ces pigments [114].

Dans la première partie de ce travail, nous avons observé un accroissement de la teneur en fructose et en glucose dans les feuilles au mois de mai. Ce phénomène coïncide avec une synthèse accrue de flavonols et de leucocyanidine. Watkin, Underhill et Neish [117] ont effectivement montré que le glucose radioactif s'incorpore facilement dans la quercétine chez le sarrazin. Cet accroissement de la teneur en glucose doit favoriser la biosynthèse des flavonoïdes à cette époque. Dans les feuilles âgées, la teneur en sucres demeure néanmoins élevée et peut correspondre à une synthèse encore importante ou bien à un ralentissement de la migration de ces substances vers le tronc.

2/ Compétition biogénétique.

Tous ces pigments flavonoïdes dérivent-ils d'un seul précurseur ?

Un certain nombre d'observations génétiques relatives à la formation de ces pigments sont en faveur d'une telle hypothèse. Dans les fleurs de dahlia, Lawrence [62 bis] a montré la présence de deux anthocyanes, la cyanine et la pelargonine et d'une flavone : l'apigénine, ces substances étant responsables de la coloration des fleurs. Lorsque dans une variété de dahlia

on observe une quantité importante d'anthocyanes, il y a peu de flavone; par contre, si l'on trouve une grande quantité de flavone, la teneur en anthocyanes est très faible.

Beale [6] a montré une compétition analogue dans le pavot où le gène anthocyane domine le gène flavone.

Les prunus dont nous avons fait l'étude, présentent dans certains cas un antagonisme leucoanthocyane-flavonol. L'abricotier et le prunier sont très riches en leucocyanidine et plus pauvres en dérivés flavoniques. Le phénomène inverse se produit dans le cas du pêcher et du cerisier de Sainte-Lucie où les leucodérivés sont très faibles. Si nous représentons le rapport des flavonols totaux sur les leucodérivés présents dans les feuilles, nous voyons qu'il varie considérablement d'une espèce à l'autre.

Tableau XV

Teneur en flavonols et en leucodérivés dans les feuilles au mois de juillet
Résultats exprimés en % poids sec

	FLAVONOLS	LEUCODÉRIVÉS	FLAVONOLS/ LEUCODÉRIVÉS
Pêcher	0,22	0,4	0,55
Cerisier de Sainte-Lucie	0,224	0,7	0,32
Merisier	0,25	1,0	0,25
Prunellier	0,338	2,1	0,16
Abricotier	0,149	1,8	0,083
Prunier	0,055	1,36	0,04

Le pêcher et le cerisier de Sainte-Lucie ont les rapports flavonols/leucodérivés les plus élevés, tandis que pour l'abricotier et le prunier, ce rapport est bien plus faible. Dans ces dernières espèces, la leucocyanidine prédomine sur les flavonols.

Par contre, en ce qui concerne la leucocyanidine et la D (+) catéchine, il ne semble pas exister un antagonisme entre ces deux constituants dans les bourgeons.

Tableau XVI

Teneur en D (+) catéchine et en leucocyanidine dans les bourgeons
Résultats exprimés en % poids sec

	D (+) CATÉCHINE	LEUCO- CYANIDINE
Prunellier	6,2	3,55
Merisier	4,9	2,27
Prunier	3,0	2,29
Pêcher	2,8	1,30
Abricotier	1,4	2,46
Cerisier de Sainte-Lucie	0,96	1,0

3/ Classification botanique et composition chimique.

Certaines substances sont caractéristiques d'une famille, d'un genre, d'une section, d'une tribu. De telles substances doivent leur présence à la persistance de processus métaboliques qui ont été préservés malgré la différenciation des espèces. Certaines molécules qui sont indispensables comme les hydrates de carbone, les acides aminés, n'auront en général pas d'importance pour la taxinomie biochimique; d'autres, comme les pigments flavonoïdes sont par contre très intéressants. Erdtman a réalisé une étude systématique des constituants flavoniques du bois de cœur des conifères, plantes très anciennes, et proposé une taxinomie biochimique [37]. Hasegawa a par ailleurs envisagé une filiation du genre *Prunus* d'après l'importance de tel ou tel type de constituants flavoniques ou flavaniques [52]. Aux deux extrémités du genre *Prunus*, Hasegawa classe d'une part la section des *Prunophores* et d'autre part, la section *Cerasus*. La première de ces sections possédant des leuco-dérivés de façon dominante et peu de composés flavoniques, tandis que dans la dernière les composés flavoniques prédominent. Les résultats que nous avons obtenus entrent dans le cadre d'une telle hypothèse. Ainsi l'abricotier, le prunier, le prunellier qui appartiennent à la section des *Prunophores* se sont révélés bien plus riches en leucocyanidine que les espèces appartenant aux sections *Amygdalus* ou *Cerasus* (cf. tableau XV). Toutefois, la valeur taxinomique des méthodes chimiques ne pourra apparaître que lorsqu'un grand nombre d'espèces auront été examinées, car il est fréquent de rencontrer des constituants chimiques voisins dans des familles pourtant très éloignées dans la classification botanique et morphologiquement très différentes. Il reste néanmoins certain que la chimie peut apporter une contribution à ce vaste problème de la filiation des espèces.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans la première partie de notre étude consacrée aux hydrates de carbone des feuilles de *P. avium*, *P. domestica* et *P. mahaleb*, nous avons observé un accroissement de la teneur en glucose et en fructose dans les jeunes feuilles qui coïncide avec une augmentation de la teneur en flavonols et en leucocyanidine. Simultanément, la teneur en saccharose décroît pour devenir minimum dans les feuilles adultes et ensuite prépondérante dans les feuilles âgées.

La deuxième partie traite des amino-acides libres des feuilles de *P. avium*, *P. domestica* et *P. mahaleb*. De même que pour les bourgeons, la composition en acides aminés libres des feuilles varie considérablement au cours de leur développement végétatif. Au début de la végétation, l'asparagine, la glutamine et la proline sont très abondantes, puis leur teneur diminue plus ou moins rapidement au cours de la croissance. Lorsque les feuilles jaunissent, la valine, la leucine et la sérine augmentent de manière appréciable dans ces trois espèces. Parmi les acides aminés aromatiques, seule la tyrosine a été mise en évidence. La phénylalanine n'a pas été décelée par chromatographie sur papier, son intégration dans les protéines ou les pigments flavonoïdes devant être très rapide.

Les acides organiques des feuilles de *P. avium*, *P. armeniaca*, *P. cerasus*, *P. domestica* et *P. mahaleb* sont étudiés dans la troisième partie.

La teneur en acide quinique, en acide citrique et en acide chlorogénique diminue au cours de la croissance des feuilles tandis que l'acide malique s'accumule dans les vieilles feuilles de toutes les espèces analysées.

Les acides cétoniques existent en très faible quantité dans les feuilles et leur évolution saisonnière n'est pas sensible. La méthode de réduction des dinitro-2,4 phénylhydrazones des acides cétoniques en acides aminés que nous utilisons permet de déceler de petites quantités de substances. Dans les feuilles prunus nous avons ainsi mis en évidence les acides hydroxypyruvique et p. hydroxyphénylpyruvique dont la présence chez les végétaux n'a été que rarement signalée. Ce dernier acide du type phénylpropane est particulièrement intéressant car nous pensons qu'il est un précurseur valable pour la biosynthèse des pigments flavonoïdes. Nous n'avons pas décelé par contre l'acide phénylpyruvique dont le rôle de précurseur des flavonoïdes et de la lignine est actuellement démontré. Son absence dans les feuilles peut s'expliquer par une grande labilité et une intégration très rapide dans le squelette des flavones.

L'acétate de potassium radioactif administré à des feuilles en survie est rapidement métabolisé. Il s'intègre principalement dans le cycle tricarboxylique en donnant naissance à de l'acide glutamique, à de la proline et à de l'acide γ aminobutyrique. Les hydrates de carbone sont aussi très radioactifs. Dans les mêmes conditions, les dérivés flavoniques sont dépourvus de radioactivité, ce qui tend à montrer que chez le merisier la biosynthèse de ces molécules est très lente à partir de l'acétate de potassium.

Dans la dernière partie, nous avons déterminé les principaux pigments du type flavonoïde présents dans les feuilles et les bourgeons de quelques *Prunus* : *P. armeniaca*, *P. avium*, *P. cerasus*, *P. domestica*, *P. mahaleb*, *P. persica* et *P. spinosa*. Les pigments quantitativement les plus importants que nous avons mis en évidence sont la D (+) catéchine (tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavane 3 ol), la leucocyanidine (tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavane 3, 4 diol), la taxifoline (tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavane 3 ol), l'aromadendrine (trihydroxy-5, 7, 4' flavane 3 ol). La quercétine (tétrahydroxy 5, 7, 3', 4' flavone 3 ol) et le kaempférol (trihydroxy-5, 7, 4' flavone 3 ol) se trouvent dans les feuilles de *Prunus* sous forme hétérosidique. Le rutoside (quercétine-3 rhamnoglucoside) a été identifié dans les feuilles de quatre espèces de *Prunus*.

La teneur en catéchine est généralement forte dans les bourgeons et les jeunes feuilles. La période optimum qui permettrait par administration d'un précurseur radioactif d'étudier la biogénèse de la catéchine et ses interrelations éventuelles avec les autres dérivés flavonoïdes se situe au début de la végétation.

Les flavanonols ont également été trouvés dans les bourgeons et les jeunes pousses feuillées; leur teneur baisse rapidement au cours de la croissance des feuilles alors que les flavonols deviennent très abondants. La période la plus favorable pour déterminer le rôle des flavanonols dans la biogénèse des flavonoïdes est précisément celle où l'on observe la diminution de leur teneur dans les feuilles et l'accroissement de la teneur en flavonols. L'administration d'un flavanonol radioactif à cette époque permettrait de vérifier l'hypothèse de transformation des flavanonols en flavonols.

En ce qui concerne la leucocyanidine, la période la plus indiquée pour l'étude de sa biosynthèse à l'aide de précurseurs marqués se situe aux mois de mai ou juin au moment où la synthèse de cette molécule est la plus importante dans les feuilles.

Dans les feuilles âgées, la teneur en flavonols diminue beaucoup, et la méthode des traceurs appliquée à ce moment montrerait alors s'il existe des transformations métaboliques des flavonols (en anthocyanes par exemple) ou simplement des phénomènes de migration.

Quelques remarques découlent de cette étude effectuée sur plusieurs espèces du genre *Prunus*. La richesse de *P. armeniaca* et *P. domestica* en acide chlorogénique par rapport aux autres espèces est probablement responsable de la grande résistance aux infections de ces deux plantes puisqu'il a par ailleurs été montré que cet acide joue un rôle de défense contre les microorganismes.

Ces trois espèces *P. armeniaca*, *P. domestica* et *P. spinosa* appartiennent d'ailleurs à la même section botanique des *Prunophores*. Ces *Prunus* sont aussi très riches en leucodérivés par rapport aux espèces appartenant à

d'autres sections. La classification de ces espèces dans les Prunophores correspond à une constitution chimique voisine.

Il doit exister également une biosynthèse compétitive entre la formation de la leucocyanidine et celle des flavonols, car si l'on considère les espèces de cette section, on remarque que le rapport flavonols/leucodérivés est très faible. Chez d'autres espèces, comme *P. persica* ou *P. mahaleb* on observe le phénomène inverse, c'est-à-dire un rapport flavonols/leucodérivés bien plus élevé. Le nombre des espèces examinées est cependant trop faible pour en tirer des conclusions d'une portée générale. Nous avons néanmoins fait une constatation nouvelle sur la richesse de quelques prunus en leucodérivés et en flavonols.

Les techniques mises en œuvre dans le présent travail nous ont permis d'apporter quelques connaissances supplémentaires sur la constitution chimique, en particulier des pigments flavonoïdes des feuilles, et de suivre leurs variations saisonnières.

Il est certain qu'à l'heure actuelle, le maximum de connaissances est souhaitable pour l'application de la méthode des traceurs aux différents problèmes de biogénèse. Ces données apportent également des arguments dans le domaine de la biochimie comparée et de la filiation des espèces.

RÉFÉRENCES

- [1] ACHER R., FROMAGEOT C. et JUTISZ M. - Biochim., Biophys. Acta (1950) 5, p. 81.
- [2] BARRENSCHEEN H. et PERKAM A. - Z. Physiol. Chem. (1941), 272, p. 81.
- [3] BATE-SMITH E.C. - J. Expl. Bot. (1953), 4, p. 1.
- [4] BATE-SMITH E.C. - Biochem. J. (1954) 58, p. 122.
- [5] BATE-SMITH E.C. - Roy. Proc. Dubl. Soc. (1956) n°6 L, p. 165.
- [6] BEALE G.H. et ROBINSON G.M. - J. Genet. (1939), 37, p. 375.
- [7] BENTLEY L.E. - Nature (1953), 171, p. 610.
- [8] BIDWELL R., KROTOV G. et REED G. - Can. J. of Bot. (1952) 30, p. 291.
- [9] BIRCH A. - Perspectives in Org. Chem. Inters. Publishes N. Y. (1956) p. 149.
- [10] BIRCH A. et CLARK-LEWIS - J. Chem. Soc. (1957), p. 3586.
- [11] BIRCH A. J. et DONOVAN F. W. - Austral. J. Chem. (1953) 6, p. 360.
- [12] BLANK F. - Bot. Review (1947) 13, p. 241.
- [13] BOTTOMLEY W. - Chem. and Ind. (1954), p. 516.
- [14] BRAY H., THORPE W., WHITE K. - Biochem. J. (1950), 46, p. 271.
- [15] BRYANT F. et OVERELL B.T. - Biophys., Biochim. Acta (1953), 10, p. 471.
- [16] CALVIN M. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1956), 38, p. 1233.
- [17] CARLES J. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1957), 39, p. 1177.
- [18] CARLES J. et LATTES F. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1959), 249, p. 447.
- [19] CHEVREUL M.E. (1832) - D'après KARRER dans Konstitution und Vorkommen der organische pflanzenstoffe (Birkhäuser Verlag, Basel) 1958.
- [20] CHIBNALL A.C. - Protein Metabolism in the plant, Yale University Press (1939).
- [21] CHOPIN J., MOLHO D., PACHECO H. et MENTZER C. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1956), 243, p. 712.

- [22] CHOPIN J. et PACHECO H. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1958), 40, p.1593.
- [23] COLLOT A.M. et RABATE J. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1936), 202, p.1208.
- [24] COMBES R. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1909), 148, p.790.
- [25] COMTE P. - Thèse Doctorat de l'Université de Lyon (1958).
- [26] CRONENBERGER L. et CUZIN G. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1954), 36, p.715.
- [27] CRONENBERGER L. - Thèse Doctorat de l'Université de Lyon (1956).
- [28] CRONENBERGER L. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1959), 249, p.475.
- [29] CRONENBERGER L., VALLET C., NETIEN G. et MENTZER C. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1955), 241, p.1161.
- [30] CRONENBERGER L. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1959), 249, p.2423.
- [31] CRONENBERGER L. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1959), 249, p.2866.
- [32] DAVIS B.D. - Biochim. Biophys. Acta (1954), 15, p.268.
- [33] DAVIS B.D. - Advance Enzymol. (1955), 16, p.247.
- [34] DAVIS B.D. - Symposium on Amino acid Metabolism - J. Hopkins Press (1955) p.7.
- [35] DUPERON R. - Rev. Gen. Bot. (1956), 63, p.137.
- [36] ELLIOTT W.H. - J. Biol. Chem. (1953), 201, p.661.
- [37] ERDTMAN H. - Colloque des Heterocycles oxygénés - Lyon (1955).
- [38] ESENBECK N. - Ann. der Chem. (1832), 1, p.243.
- [39] FORSYTH W. - Bio. j. (1952), 51, p.511.
- [40] FORSYTH W. - Chem. and Ind. (1959), p.755.
- [41] FREUDENBERG K. - Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. (1956), 27, p.153.
- [42] FREUDENBERG K., BOHME O. et BECKENDORF A. - Ber. (1921), 54, p.1204.
- [43] FRIEDEN C. et VELICK S. - Biochim. Biophys. Acta (1957), 23, p.439.
- [44] GAUMANN E. - Ber. Schweiz. bot. ges. (1935), 44, p.157.
- [45] GEISSMAN T. et SWAIN T. - Chem. and Ind. (1957), p.984.
- [46] GORTER K. - Arch. Pharm. (1909), 247, p.184.
- [47] GRISEBACH H. - Z. Naturforsch. (1957), 12 b, p.597.
- [48] GUICHARD C. - Thèse Doctorat Sci. Bordeaux - (1953).
- [49] GUICHARD C. - Rev. Gen. Bot. (1955), 62, p.117.
- [50] HASEGAWA M., SHIRATO T. - Am. Soc. (1954), 76, p.5560.
- [51] HASEGAWA M., NAKAMURA H., TSURUNO S. - J. Japan. Foest. Soc. (1956), 38, p.107.
- [52] HASEGAWA M. - J. of Japan Forestry (1958), 40 n°3, p.111.

- [53] HATTORI S. et SHIMOKORIYAMA - Sci. Proc. of the Royal Dublin Soc. (1956), 27, p.139.
- [54] HERGERT H.L. et KURTH E.F. - J. org. chem. (1953), 18, p. 521.
- [55] HILLIS E. - Austral. J. of Bio. Sci. (1956), 9, p. 263.
- [55 bis] HILLIS E. et SWAIN T. - J. Sci. Food Agri. (1959), 10, p. 135.
- [56] HULME A.C. - Nature (1953), 171, p. 610.
- [57] HULME A.C. - Colloque sur la qualité végétale - Paris (1957).
- [58] INGLETT G.E. - J. of Org. Chem. (1958), 23, p. 93.
- [59] ISHERWOOD F. et LUMBEN R. - Nature (1955), 175, p. 419.
- [60] JOSLYN M.A., PETERSON R. - Nature (1956), 178, p. 318.
- [61] LANGLOIS-PLATEL S. ET MENTZER C. - Compt. Rend. Acad.Sci. (1955), 240, p. 1137.
- [62] LAVOLLAY J. et VIGNAU M. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1943), 217, p. 86.
- [62 bis] LAWRENCE W.J.C. et PRICE J.R. - Biol. Rev. (1940), 15, p. 35.
- [63] LEBRETON P. - P.J. Brass. Belge (1957); 2641, p.253, 2642, p.275 , et 2643 p.288.
- [64] LIPPMA T. - Ber. dtsch. Bot. ges. (1928), 46, p. 267.
- [65] MARTIN C. et MOREL G. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1958), 246, p. 2283.
- [66] MAURICE A. et MENTZER C. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1954), 36, p. 369.
- [67] MENTZER C. - Conf. du Centre de Perf. tech., Presses doc. Paris, Fasc. n°2907.
- [68] MENTZER C. et PACHECO H. et VILLE A. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1954), 36, p. 1137.
- [69] MENTZER C. et CRONENBERGER L. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1955), 37, p. 371.
- [70] MOLISH H. - Pflanzenbiologie in Japan - (Iena. Gustav Fisher 1922).
- [71] MORTREUIL M. et KHOUVINE Y. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1954), 36, p. 425.
- [72] NORD F. et SCHUBERT W. - J. Amer. Chem. Soc. (1957), 79, p. 251.
- [73] OVERTON E. - Nature (1899), 59, p. 296.
- [74] PACHECO H. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1954), 36, p. 667.
- [75] PACHECO H. et CHADENSON M. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1956), 242, p. 162.
- [76] PACHECO H. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1959), 248, p. 2636.
- [77] PACHECO H. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1957), 39, p. 971.
- [78] PACHECO H., CRONENBERGER L. et MENTZER C. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1957), 39, p. 439.

- [79] PARTRIDGE S.M. - Biochem. J. (1948), 42, p.238.
- [80] PARTRIDGE S.M. - Nature (1949, 164, p.443).
- [81] PEACH K. et TRACEY M. V. - Springer Verlag Berlin (1955), p.494.
- [82] PERKIN A.G. et YOSHITAKE - Journ. of chem. Soc. (1902), 81 , p.1160.
- [83] PEW J.L. - J. Amer. Chem. Soc. (1948), 70, p.3031.
- [84] PLOUVIER V. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1959), 249, p.1563.
- [85] PLOUVIER V. - Compt. Rend. Acad. Sci. (1960), 250, p.1721.
- [86] QUACKENBUSH F.W. - J. Amer. Chem. Soc. (1956), 78, p.3123.
- [87] QUACKENBUSH F.W. - Science (1955) 122, p.1186.
- [88] RAUTENAN N. - Ann. Acad. Sci. Gen. (1948), 33, p.1.
- [89] REICHEL L. et STENDHAL J. - Ann. der Chem. (1942), 553, p.83.
- [90] ROBINSON G. - Biochem. J. (1933), 27, p.206.
- [91] ROBINSON G. - Nature (1936), 137, p.132.
- [92] ROSENHEIM O. - Biochem. J. (1920), 14, p.178.
- [93] ROUX G. et BILL M.C. - Nature (1959), 183, p.42.
- [94] RUCKENBROD M. - Planta (1955), 46, p.19.
- [95] SALLACH H.J. - J. Biol. Chem. (1956) 223, p.1101.
- [96] SANDO C.E. - J. Biol. Chem. (1937), 117, p.45.
- [97] SCHEELE G.C. - Journal de Crel (1784) II, p.1 - cité par le traité de chimie organique de V.GRIGNARD - tome XI, p.118, 235,285 et 362.
- [98] SANNIE C. et SAUVAIN H. - La couleur des fleurs et des fruits - Ed. du Museum - Paris - 1952.
- [99] SCHAAL L.A. - Am. Pot. J. (1953), 30, p.257.
- [100] SCHAAL L.A. et JOHNSON G. - Phytopath. (1955), 45, p.626.
- [101] SCHMIDT O. et HULL G. - Ber. (1947), 80, p.509.
- [102] SESHADRI T.R. - Ann. Rev. Biochem. (1951), 20, p.490.
- [103] SESHADRI T.R. - Colloque sur les heterocycles oxygénés - C.N.R.S. (1955).
- [104] SOMOGYI M. - J. Biol. Chem. (1945), p.160, 61.
- [105] SRINIVASAN P.R. - J. Biol. Chem. (1956), 223, p.913.
- [106] STEWART A., BROWN A. et NEISH A.C. - Canadian J. of Biochem. and Physiol. (1955), 33, p.948.
- [107] STEWART A., BROWN A. et NEISH A.C. - Canadian J. of Biochem. and Physiol. (1956), 34, p.769.
- [108] SWAIN T. et HULME A.C. - Nature (1951), 168, p.254.

- [109] SWAIN T. et BATE-SMITH E.C. - The Chem. of Vegetable Tannins (1956).
- [110] SYNTHESES ORGANIQUES (vol.II), p.474, Masson Ed. (1949).
- [111] TAYEAU F. et MASQUELIER J. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1948), 15, p.1167.
- [112] TAYEAU F. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1958), 40, p.671.
- [113] TOWERS G., THOMPSON J. et STEWARD F. - J. Amer. Chem. Soc. (1954), 76, p.2392.
- [114] UNDERHILL E.W., WATKIN J.F. et NEISH A.C. - Can. J. Biochem. Physiol. (1957), 37, p.219.
- [115] VERCIER P., CRONENBERGER L., VALLET C.,VILLE A.,MENTZER C. - Bull. Soc. Chim. Biol. (1956), 38, p.751.
- [116] VIRTANEN A., CSAKY T.Z. et RAUTENAN N. - Biochim. Biophys. Acta (1949), 3, p.208.
- [117] WATKIN J., UNDERHILL E. et NEISH A.C. - Canad. J. Biochem. and Physiol. (1957) 35, p.229.
- [118] WEBSTER G.C. - Nitrogen metabolism in plant - Row Petterson & Cie. N.Y. (1959), p.143.
- [119] WHITING G.C. - Nature (1957), 179, p.531.
- [120] ZAPROMETOV M. - Biokhimiya (1954), 96, p.1257.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	7
PREMIERE PARTIE - HYDRATES DE CARBONE	9
I) Conditions de prélèvement des échantillons végétaux	9
II) Détermination analytique des hydrates de carbone	10
1/ Extraction et purification	10
2/ Identification des sucres	10
3/ Dosage des sucres par chromatographie sur papier	11
III) Métabolisme des hydrates de carbone	13
DEUXIEME PARTIE - ACIDES AMINES	15
I) Méthode d'analyse des acides aminés	15
1/ Extraction et purification	15
2/ Dosage des acides aminés	15
II) Métabolisme des acides aminés	16
TROISIEME PARTIE - ACIDES ORGANIQUES	21
I) Acides alcools	21
1/ Détermination analytique	23
a) Extraction et purification	23
b) Détermination qualitative	23
c) Détermination quantitative	24
2/ Métabolisme	24
II) Acide acétique	26
1/ Métabolisme de l'acide acétique radioactif	26
a) Synthèse de l'acétate de potassium radioactif	27
b) Absorption de l'acétate radioactif	28
c) Etude des composés flavoniques et des anthocyanes	28
d) Etude des sucres, acides organiques, acides aminés	28
2/ Discussion	31
III) Acides cétoniques	32
1/ Détermination analytique	33
a) Dosage colorimétrique des acides cétoniques	33
b) Réduction des hydrazones en acides aminés	34
2/ Métabolisme	34

	Pages
IV) Acide chlorogénique	36
1/ Identification de l'acide chlorogénique	36
2/ Métabolisme	37
QUATRIEME PARTIE - PIGMENTS FLAVONOIDES	39
I) D (+) Catéchine	40
1/ Identification de la D(+) Catéchine	40
2/ Variations saisonnières de la D(+) Catéchine	42
II) Leucocyanidine	46
1/ Détermination analytique de la leucocyanidine	46
2/ Variations saisonnières de la leucocyanidine	48
III) Flavanonols	50
1/ Détermination analytique	51
2/ Métabolisme de la taxifoline et de l'aromadendrine	51
a) Evolution saisonnière	51
b) Essai de métabolisme de la taxifoline	53
IV) Flavonols	53
1/ Isolement du rutoside	54
2/ Identification du kaempférol	55
3/ Variations saisonnières de la quercétine et du kaempférol	58
V) Biosynthèses et Interrelations des pigments flavonoïdes	60
1/ Biosynthèse des flavonoïdes	60
2/ Compétition biogénétique	63
3/ Classification botanique et composition chimique	65
CONCLUSIONS GENERALES	67
REFERENCES	71

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

APPLICATION DU RADIOCARBONE A L'ETUDE DE LA BIOSYNTHESE
DES FLAVONOIDES ET DE LA LIGNINE

Vu :

Les Membres du Jury :

R. KUHNER

J. COLONGE

J. CHOPIN

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences ,

H. GAUTHIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

Lyon, le 10 juin 1960.

Le Recteur :

Président du Conseil de l'Université

A. ALLIX

IMP. LOUIS-JEAN - GAP

Dépôt légal n° 132 - 1960

